

Untersuchungen zur Reparatur Methylmethansulfonat- induzierter DNA-Schäden

**Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
zur**

**Erlangung des akademischen Grades
eines Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

genehmigte Dissertation von


**Dipl.-Biol. Michael Ensminger
aus Neunkirchen (Saar)**

Darmstadt 2011

D17

Referent: Prof. Dr. Markus Löbrich
Koreferent: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 21. Dezember 2011
Tag der mündlichen Prüfung: 12. März 2012



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2007 bis Dezember 2011 am Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes sowie in der Abteilung Strahlenbiologie und DNA-Reparatur der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Markus Löbrich angefertigt.



meinen Eltern und
meiner Oma



Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und noch nicht veröffentlicht.

Darmstadt, den 21. Dezember 2011

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Zusammenfassung / Summary	1
2 Einleitung.....	4
2.1 Schädigende Einflüsse auf die DNA	4
2.1.1 Endogene und exogene Quellen für DNA-Schäden	4
2.1.2 Strahlenphysikalische Grundlagen.....	5
2.1.2.1 Ionisierende Strahlung und ihre Wechselwirkung mit Materie	5
2.1.2.2 Direkter und indirekter Strahleneffekt.....	7
2.1.2.3 Strahleninduzierte DNA-Schäden	8
2.2 Zelluläre Schadensantwort auf DNA-Doppelstrangbrüche	9
2.2.1 Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	9
2.2.2 Mechanismen der Zellzykluskontrolle	12
2.3 DSB-Reparaturprozesse.....	13
2.3.1 Die Nichthomologe Endverknüpfung.....	14
2.3.2 Die Homologe Rekombination	18
2.3.2.1 Resektion der Bruchenden und Anlagerung von Rad51	19
2.3.2.2 Unterwege der HR: synthesis dependent strand annealing und HR über eine doppelte Holliday-Struktur	20
2.3.2.3 Auflösung der doppelten Holliday-Struktur.....	23
2.4 DNA-Reparaturprozesse in der S-Phase.....	24
2.4.1 Induktion Replikations-assoziiierter DNA-Schäden	24
2.4.2 Mechanismen der Reparatur arretierter Replikationsgabeln.....	26
2.4.3 Mechanismen der Reparatur kollabierter Replikationsgabeln.....	31
2.5 Die DNA-schädigende Wirkung von Methylmethansulfonat (MMS).....	34
2.5.1 MMS-induzierte Basenmethylierungen	34
2.5.2 Reparatur MMS-induzierter Basenmethylierungen	35
2.5.3 Die Basen-Exzisionsreparatur (BER).....	36
2.5.4 Zusammenhang einer MMS-Behandlung mit der Induktion von DSBs.....	38
2.6 Zielsetzung	39
3 Material und Methoden	40
3.1 Material.....	40
3.1.1 Chemikalien	40

3.1.2 Medien und Zusätze für Zellkultur	41
3.1.3 Lösungen	41
3.1.4 Antikörper und Kits	42
3.1.5 siRNA	43
3.1.6 Verbrauchsmaterialien	43
3.1.7 Geräte	44
3.1.8 Computerprogramme	45
3.1.9 Zelllinien	45
3.2 Methoden	48
3.2.1 Zellkultivierung	48
3.2.1.1 Kultivieren und Passagieren	48
3.2.1.2 Aussäen von Zellen	48
3.2.1.3 Zellzahlbestimmung mittels Häemocytometer	49
3.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen	49
3.2.1.5 transiente Transfektion von Zellen mit siRNA	50
3.2.2 Induktion von DNA-Schäden	51
3.2.2.1 Röntgenbestrahlung von Zellen	51
3.2.2.2 Behandlung von Zellen mit MMS	52
3.2.2.3 Behandlung von Zellen mit spezifischen Kinase-Inhibitoren	52
3.2.3 Zellzyklusspezifische Immunfluoreszenz-Analysen	53
3.2.3.1 BrdU- und EdU-Markierung replizierender Zellen	53
3.2.3.2 Fixierung von Zellen auf Deckgläsern	53
3.2.3.3 γ H2AX/BrdU-Doppelfärbung	54
3.2.3.4 γ H2AX/EdU-Doppelfärbung	54
3.2.3.5 Immunfluoreszenz-Färbungen gegen Rad51 und 53BP1	55
3.2.3.6 γ H2AX/pH3-Doppelfärbung	56
3.2.3.7 Auswertung der Foci-Färbungen	56
3.2.3.8 Identifizierung von Zellzyklusphasen in der Immunfluoreszenz	56
3.2.4 Durchflusszytometrische Methoden	57
3.2.4.1 Ernten von Zellen für FACS-Analysen	57
3.2.4.2 BrdU/PI-Färbung	58
3.2.4.3 Messen der Proben im Durchflusszytometer	58
4 Ergebnisse	59
4.1 Etablierung einer S-Phase-spezifischen γH2AX-Immunfluoreszenzanalyse zur Untersuchung MMS-induzierter DNA-Schäden	59
4.1.1 Methodischer Ansatz zu Analyse von γ H2AX-Foci in der S-Phase	59
4.1.2 Untersuchung des γ H2AX-Reparaturverhaltens nach Bestrahlung in der S-Phase	61

4.1.3	Zellzyklus-spezifische Bestimmung der γ H2AX-Induktion nach einer Behandlung mit MMS	64
4.1.4	Bestimmung des Beitrags der Kinasen ATM, ATR und DNA-PK bei der Phosphorylierung von H2AX nach MMS	65
4.2	Charakterisierung des Reparaturverhaltens MMS-induzierter γH2AX-Foci	68
4.2.1	γ H2AX-Reparaturkinetiken nach unterschiedlichen MMS-Konzentrationen	68
4.2.2	Untersuchung der Auswirkung einer MMS-Behandlung auf das Zellzyklusverhalten.....	70
4.3	BER-Intermediate tragen zur DNA-schädigenden Wirkung von MMS bei	74
4.3.1	Untersuchung des Induktions- und Reparaturverhaltens MMS-induzierter γ H2AX-Foci in XRCC1-defizienten Zellen.....	74
4.3.2	Untersuchung des Beitrags von BER-Intermediaten und methylierten Basen an der Replikations-hemmenden Wirkung von MMS	77
4.4	Beitrag von HR und NHEJ an der Reparatur MMS-induzierter γH2AX-Foci	79
4.4.1	Untersuchung des Reparaturverhaltens MMS-induzierter γ H2AX-Foci in HR- und NHEJ-defizienten humanen Fibroblasten	80
4.4.2	Untersuchung des Reparaturverhaltens MMS-induzierter γ H2AX-Foci in Hamster-Zelllinien und in humanen A549-Zellen mittels RNAi-Technik.....	82
4.4.3	Bestimmung des Beitrags des NHEJ an der Reparatur MMS-induzierter γ H2AX-Foci unter Bedingungen einer HR-Defizienz	85
4.5	MMS-induzierte Replikations-Schäden verhindern die Einleitung der Mitose	86
4.5.1	Analyse MMS-induzierter γ H2AX-Foci in mitotischen Zellen	86
4.5.2	Analyse MMS-induzierter γ H2AX-Foci in praemitotischen Zellzyklus-Stadien.....	90
4.6	Unterschiede in den beteiligten Reparatur-Faktoren an den HR-Prozessen in der S- und der G2-Phase	93
4.6.1	Untersuchung der Beteiligung von ATM, ATR und Artemis an den HR-Prozessen nach MMS und nach Bestrahlung in der G2-Phase	94
4.6.2	Untersuchung des Einflusses von ATM, ATR und Artemis auf das Zellzyklusverhalten nach MMS	97
4.6.3	Untersuchung der Beteiligung der Mediatorproteine 53BP1 und MDC1 an den HR-Prozessen nach MMS und nach Bestrahlung in der G2-Phase	98
5	Diskussion.....	102
5.1	Etablierung einer S-Phase-spezifischen γH2AX-Immunfluoreszenzanalyse zur Untersuchung MMS-induzierter DNA-Schäden.....	102
5.1.1	Methodischer Ansatz zu Analyse von γ H2AX-Foci in der S-Phase	102
5.1.2	Untersuchung des γ H2AX-Reparaturverhaltens nach Bestrahlung in der S-Phase	103

5.1.3 Zellzyklus-spezifische Bestimmung der Induktion von γ H2AX-Foci nach Behandlung mit MMS.....	106
5.2 Beitrag von BER-Intermediaten zur schädigenden Wirkung von MMS	107
5.2.1 Während der BER erzeugte SSBs tragen zur Ausbildung Replikations- assoziierter DNA-Schäden nach MMS bei.....	107
5.2.2 MMS-induzierte Basenschäden und während der BER erzeugte SSBs hemmen die Replikation.....	110
5.3 MMS-induzierte γH2AX-Foci treten an ein-endigen DSBs auf	114
5.3.1 Bewertung der Beobachtungen nach MMS-Behandlung im Vergleich zu anderen S-Phase-schädigenden Agenzien.....	114
5.3.2 ATM wird an MMS-induzierte, ein-endige DSBs rekrutiert.....	117
5.3.3 Detektion MMS-induzierter, ein-endiger DSBs mit alternativen Methoden	118
5.4 Charakterisierung der γH2AX-Reparaturkinetiken nach MMS.....	120
5.5 MMS-induzierte DSBs werden über den Weg der HR repariert	122
5.5.1 Analyse MMS-induzierter γ H2AX-Foci in HR- und NHEJ-defizienten Zellen.....	122
5.5.2 Analyse von Rad51-Foci nach Behandlung mit MMS.....	126
5.5.3 Bestätigung der HR-Abhängigkeit MMS-induzierter DSBs auf chromosomaler Ebene.....	127
5.6 MMS-induzierte Replikations-Schäden verhindern die Einleitung der Mitose ..	129
5.6.1 Analyse MMS-induzierter γ H2AX-Foci in mitotischen Wildtyp-Zellen	129
5.6.2 Analyse MMS-induzierter γ H2AX-Foci in praemitotischen Zellzyklus-Stadien einer Wildtyp-Zelllinie	131
5.6.3 Analyse MMS-induzierter γ H2AX-Foci in mitotischen Zellen und praemitotischen Zellzyklus-Stadien einer HR-defizienten Zelllinie.....	134
5.7 Die HR-Prozesse in der S- und der G2-Phase unterscheiden sich in den beteiligten Reparaturfaktoren	137
5.7.1 ATM und Artemis sind nicht an der Reparatur MMS-induzierter DSBs beteiligt	137
5.7.2 MDC1 und 53BP1 besitzen unterschiedliche Funktionen bei den HR- Prozessen in der S- und der G2-Phase	140
5.7.3 ATR besitzt keine Funktion bei der Reparatur MMS-induzierter DSBs.....	142
5.8 Ausblick	143
6 Literaturverzeichnis	XI
7 Anhang.....	XXVII
7.1 Lebenslauf	XXVII
7.2 Publikationen und Tagungsbeiträge.....	XXVIII
7.3. Danksagung.....	XXIX

Abbildungsverzeichnis

Abb.2.1: Prozesse der Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie.....	6
Abb.2.2: Direkter und indirekter Strahleneffekt ionisierender Strahlung	8
Abb.2.3: Initiale Aktivierungsereignisse von ATM und ATR nach DNA-Schädigung	10
Abb.2.4: Schematische Darstellung des Zellzyklus	13
Abb.2.5: Grundlegende Prinzipien der Nichthomologen Endverknüpfung (NHEJ) und der Homologen Rekombination (HR)	17
Abb.2.6: Unterwege der HR an zwei-endigen DSBs: <i>synthesis dependent strand annealing</i> (SDSA) und HR via <i>double Holliday junction</i> (dHJ-HR).....	21
Abb.2.7: Unterschiedliche Ursachen Replikations-abhängiger DNA-Schäden.....	25
Abb.2.8: Reparaturwege zur Überwindung einer Replikations-Blockade	28
Abb.2.9: D-Loop-abhängige Reaktivierung der Replikation aus einer „chicken foot“- Struktur	30
Abb.2.10: Reparatur eines ein-endigen DSBs über den Weg der <i>break-induced replication</i> (BIR)	32
Abb.2.11: Reparatur eines ein-endigen DSBs mit Hilfe einer zweiten Replikationsgabel	33
Abb.2.12: Methylierungsstellen von MMS in den DNA-Basen Guanin und Adenin.....	34
Abb.2.13: Die Basen-Exzisionsreparatur	37
Abb.4.1: Zellzyklus-spezifische γ H2AX-Immunfluoreszenz-Analyse bestrahlter Hamster- zellen	60
Abb.4.2: γ H2AX-Reparaturverhalten HR- und NHEJ-defizienter CHO-Zellen nach Bestrahlung in der G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklus	62
Abb.4.3: Zellzyklus-spezifische Induktion von γ H2AX-Foci nach unterschiedlichen MMS- Behandlungen	64
Abb.4.4: Abhängigkeit MMS- und strahleninduzierter γ H2AX-Foci von den Kinasen ATM, ATR und DNA-PK.....	67
Abb.4.5: γ H2AX- und Rad51-Reparaturkinetiken in HSF1-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen MMS	69
Abb.4.6: Repräsentative Auswertung einer durchflusszytometrischen Untersuchung nach MMS	71
Abb.4.7: Zellzyklusverhalten von HSF1 nach unterschiedlichen MMS-Konzentrationen	72

Abb.4.8: γ H2AX-Induktionsverhalten XRCC1-defizienter Zellen nach MMS	75
Abb.4.9: γ H2AX-Reparaturverhalten XRCC1-defizienter Zellen nach MMS	77
Abb.4.10: Zellzyklusverhalten MMS-behandelter CHO-9- und EM-C11-Zellen.....	78
Abb.4.11: γ H2AX- und Rad51-Reparaturkinetiken HR- und NHEJ-defizienter Zellen nach einer Behandlung mit 1,5 mM MMS	80
Abb.4.12: Zellzyklusverhalten von HSF1-, 180BR- + HSC62-Zellen nach 1,5 mM MMS.....	81
Abb.4.13: γ H2AX-Kinetiken HR- und NHEJ-defizienter CHO-Zellen nach einer Behandlung mit 1,5 mM MMS	83
Abb.4.14: Induktion und Reparatur von γ H2AX-Foci nach 1,5 mM MMS in A549-Zellen nach Depletion unterschiedlicher Reparatur-Faktoren mittels siRNA	84
Abb.4.15: Einfluss einer Inhibition der DNA-PK auf die Reparatur MMS-induzierter γ H2AX-Foci	86
Abb.4.16: MMS-induzierte γ H2AX-Foci in mitotischen Zellen	88
Abb.4.17: Korrelation MMS-induzierter γ H2AX-Foci mit dem pH3-Signal in praemito- tischen Zellzyklus-Phasen	92
Abb.4.18: γ H2AX- und Rad51-Kinetiken unterschiedlicher Reparaturmutanten nach 1,5 mM MMS in der S-Phase oder Bestrahlung mit 2 Gy in der G2-Phase	96
Abb.4.19: Zellzyklusverhalten von HSF1-, AT1BR-, CJ179- und F02-98 hTert-Zellen nach 1,5 mM MMS	97
Abb.4.20: γ H2AX-Reparaturkinetiken 53BP1- und MDC1-depletierter A549-Zellen nach 1,5 mM MMS in der S-Phase oder Bestrahlung mit 2 Gy in der G2-Phase	100
Abb.5.1: Unterschiedliche Prozesse tragen zur DNA-schädigenden Wirkung von MMS bei.....	113

Tabellenverzeichnis

Tab.3.1: verwendete siRNA-Sequenzen für eine spezifische Depletion der angegebenen Faktoren	43
Tab.3.2: verwendete Endkonzentrationen und Inkubationszeiten der eingesetzten siRNAs.....	50
Tab.3.3: Für die Transfektion von A549 eingesetzte Zellzahlen und Mengen an Medium, siRNA, Medium ohne alles und HiPerFect-Reagenz für Versuchsansätze über 48 h und 72 h.....	51
Tab.3.4: Dosisleistungen der Röntgenröhren Isovolt Titan E und MCN 165/796704 auf definierten Höhen über dem Austrittsfenster der Röhre bei einer Beschleunigungsspannung von 90 kV und einer Stromstärke von 19 mA	52

Abkürzungsverzeichnis

5'-dRP	5'-Desoxyribosephosphat
53BP1	<i>p53 binding protein 1</i>
Abb.	Abbildung
APE1	Apurinische/Apyrimidinische Endonuklease 1
AT	<i>Ataxia telangiectasia</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATMi	ATM-Inhibitor
ATR	<i>ATM and Rad3 related</i>
ATRIP	<i>ATR interacting protein</i>
BER	Basen-Exzisionsreparatur
BIR	<i>break-induced replication</i>
Bp	Basenpaar
BLM	Bloom-Protein
BRCA1/2	<i>breast cancer 1/2</i>
BrdU	5-Bromo-2'-desoxy-Uridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (<i>Cyclin-dependent kinase</i>)
CENP-F	Centromer-Protein F
Chk1/2	<i>cell cycle checkpoint kinase 1/2</i>
CHO	Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (<i>Chinese hamster ovary</i>)
CPT	Camptotecin
CtIP	<i>CtBP-interacting protein</i>
DAPI	4'-6'-Diamino-2-Phenyl-indoldihydrochlorid
dHJ	Doppelte Holliday-Struktur (<i>double holliday junction</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PKcs	Katalytische Untereinheit der DNA-PK (<i>catalytic subunit of DNA-PK</i>)
DNA-PKi	DNA-PK-Inhibitor
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
dRP	Desoxyribosephosphat
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>double-stranded DNA</i>)
EDTA	Ethylendiamidtetraacetat
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxy-Uridin
Eme1	<i>essential meiotic endonuclease 1</i>
eV	Elektronenvolt

FACS	<i>fluorescence activated cell scanning/sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FEN-1	<i>flap endonuclease 1</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Gen1	<i>XPG-like endonuclease 1</i>
Gy	Gray (Einheit der Strahlendosis)
HR	Homologe Rekombination
hTert	<i>human telomerase reverse transcriptase</i>
HU	Hydroxyharnstoff (<i>hydroxyurea</i>)
IgG	Immunglobulin G
IR	ionisierende Strahlung (<i>ionising radiation</i>)
KAP-1	<i>KRAB associated protein 1</i>
LET	Linearer Energie-Transfer
LMDS	<i>locally multiply damaged sites</i>
MDC1	<i>mediator of damage control 1</i>
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
MGMT	O6-Methylguanin-Methyltransferase
MMS	Methylmethansulfonat
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
MRE11	<i>meiotic recombination 11</i>
MRN	MRE11/Rad50/NBS1-Komplex
Mus81	<i>MMS and UV sensitive 81</i>
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren (<i>non essential amino acids</i>)
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (<i>non-homologous end-joining</i>)
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCC	<i>premature chromosome condensation</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PI	Propidiumiodid
PIKK	Phosphatidylinositol-3-Kinase-ähnliche Kinase
Pol	DNA-Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
RPA	Replikationsprotein A (<i>replication protein A</i>)



rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotation per minute</i>)
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute
RS-SCID	<i>radiation-sensitive severe combined immunodeficiency</i>
RT	Raumtemperatur
SDSA	<i>synthesis dependent strand anealing</i>
siRNA	<i>small interference RNA</i>
SSB	Einzelstrangbruch (<i>single-strand break</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single-stranded DNA</i>)
Tab.	Tabelle
TLS	<i>translesion synthesis</i>
TopoI	DNA-Topoisomerase I
UV	Ultraviolett
V(D)J	<i>variable (diversity) joining</i>
VE-Wasser	voll entionisiertes Wasser
WRN	Werner-Protein
WT	Wildtyp
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XRCC	<i>X-ray repair cross-complementing</i>

1 Zusammenfassung / Summary

Die DNA-schädigende Wirkung von alkylierenden Agenzien wie Methylmethansulfonat (MMS) wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht. Einige Studien ergaben dabei Hinweise darauf, dass sich die schädigende Wirkung dieser Substanzen hauptsächlich während der S-Phase des Zellzyklus manifestiert. Diese Theorie kann anhand der meisten klassisch durchgeführten Untersuchungen wie Überlebensexperimenten oder chromosomalen Studien aber nicht überprüft werden, da diese technischen Ansätze lediglich eine Beurteilung der Wirkung eines Agens auf die gesamte, untersuchte Zellpopulation erlauben. Daher wurde in dieser Arbeit ein Zellzyklus-spezifischer Ansatz zur Analyse MMS-induzierter DNA-Schäden etabliert. Dies wurde durch eine Kombination der γ H2AX-Immunfluoreszenzanalyse mit einer Markierung replizierender Zellen durch halogenierte Thymidin-Analoga möglich. Mit Hilfe dieser Zellzyklus-spezifischen γ H2AX-Analyse konnte bestätigt werden, dass γ H2AX-Foci nach einer MMS-Behandlung fast ausschließlich während der S-Phase induziert werden. Dies stellt einen deutlichen Hinweis dafür dar, dass es nach einer MMS-Behandlung zur Ausbildung Replikations-assoziiierter DNA-Schäden kommt.

MMS-induzierte Basenmethylierungen werden durch die Basen-Exzisionsreparatur (BER) behoben, einem Prozess, der die temporäre Ausbildung von Einzelstrangbrüchen (SSB) beinhaltet. Durch die Untersuchung XRCC1-defizienter Zellen, welche die während der BER erzeugten SSBs akkumulieren, konnte in der vorliegenden Arbeit der Prozess der Ausbildung MMS-induzierter γ H2AX-Foci genauer charakterisiert werden. Diese XRCC1-defizienten Zellen zeigten nach einer MMS-Behandlung eine deutlich erhöhte Induktion an γ H2AX-Foci. Konsistent mit einer beschriebenen Hypersensitivität dieser Zellen gegenüber alkylierenden Agenzien verdeutlicht dieses Ergebnis, dass während der BER erzeugte SSBs zur Ausbildung von γ H2AX-Foci nach MMS beitragen. Hier kann ein Prozess eines *replication fork run-off* postuliert werden, wenn Replikationsgabeln auf die temporär erzeugten SSBs treffen. Dabei kommt es zur Ausbildung ein-endiger Doppelstrangbrüche (DSB), die als γ H2AX-Foci detektierbar werden. Die direkt durch MMS induzierten Basenmethylierungen tragen dagegen kaum zur Ausbildung von γ H2AX-Foci nach MMS bei. Sie können aber Replikationsgabeln transient blockieren und führen somit zusammen mit den ein-endigen DSBs zu einer verlangsamten Progression MMS-behandelter Zellen durch die S-Phase.

Zahlreiche Überlebensstudien in den letzten Jahren haben eine starke Empfindlichkeit von Zellen mit einer Defizienz im DSB-Reparaturprozess der Homologen Rekombination (HR) gegenüber MMS und anderen Alkylanzien beschrieben. Daher wird diesem Reparaturweg eine entscheidende Funktion bei der Reparatur MMS-induzierter Schäden zugeschrieben. Anhand der in dieser Arbeit angewandten Zellzyklus-spezifischen γ H2AX-Immunfluoreszenzanalyse konnte diese Annahme nicht nur bestätigt werden, die erstellten γ H2AX-Reparaturkinetiken verdeutlichen sogar eine Determinierung der nach einer MMS-Behandlung erzeugten ein-endigen DSBs für den HR-Weg. Eine Reparatur dieser Schäden über den Prozess

der Nichthomologen Endverknüpfung (NHEJ) ist dagegen selbst unter der Bedingung einer HR-Defizienz nicht möglich.

Der Prozess der HR ist aber nicht für die Reparatur Replikations-abhängiger DSBs, wie sie nach MMS auftreten, von Bedeutung. Frühere Studien dieser Arbeitsgruppe demonstrierten eine essentielle Rolle des HR-Wegs für die Reparatur Heterochromatin-assoziiierter DSBs nach einer Bestrahlung in der G2-Phase. Durch einen Vergleich des Reparaturverhaltens unterschiedlicher reparaturdefizienter Zelllinien nach einer MMS-Behandlung und nach einer Bestrahlung in der G2-Phase konnten in dieser Arbeit Unterschiede in den genetischen Anforderungen dieser beiden distinkten HR-Vorgänge detektiert werden. So besitzen die Kinase ATM und die Nuklease Artemis beispielweise essentielle Funktionen im heterochromatischen HR-Weg in der G2-Phase, für die HR-abhängige Reparatur ein-endiger DSBs nach einer MMS-Behandlung sind beide Proteine aber nicht von Bedeutung.

Anhand durchflusszytometrischer Analysen wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss einer MMS-Behandlung auf das Zellzyklusverhalten untersucht. Dabei wurden eine MMS-bedingte Verlangsamung der S-Phase-Progression sowie ein lang anhaltender Zellzyklus-Arrest in der Spät-S/G2-Phase detektiert. Der eingeleitete G2/M-Checkpoint ist dabei sehr effektiv, denn in mitotischen Zellen konnten nach einer MMS-Behandlung keine zusätzlichen Schäden in Form von γ H2AX-Foci detektiert werden. Durch die Analyse unterschiedlicher Zellzyklusstadien in der S- und G2-Phase wurden in dieser Arbeit zudem deutliche Hinweise dafür erhalten, dass Wildtyp-Zellen nach einer MMS-Behandlung für sehr lange Zeit in einem späten Stadium der S-Phase persistieren. Ein Übergang in die G2-Phase und anschließend in die Mitose scheint erst dann möglich zu werden, wenn der Großteil der MMS-induzierten, ein-endigen DSBs repariert wurde. Auf HR-defiziente Zellen ist dieses Verhalten aber nicht uneingeschränkt übertragbar, denn diese Zellen können mit einer erhöhten Zahl unreparierter DSBs in die G2-Phase progressieren. Ein Übergang in die Mitose wird aber auch in HR-defizienten Zellen unterbunden. Worauf dieses unterschiedliche Zellzyklusverhalten von HR-defizienten und Wildtyp-Zellen basiert, ist noch unklar und wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

The toxic and mutagenic effects of alkylating agents like methyl methanesulfonate (MMS) were intensively investigated over the last decades. Some studies indicated that MMS develops its toxic effect only during the S phase of the cell cycle. The most commonly used techniques to analyze the effects of MMS were survival assays or chromosomal studies. However, these techniques only allow an estimation of the impact of MMS on the whole cell population. The theory of a S-phase mediated effect of MMS cannot be confirmed by these assays. In this study, therefore, a cell-cycle specific assay was established by combining the technique of γ H2AX immunofluorescence analysis with a labeling of replicating cells with halogenated analogues of thymidin. By using this cell-cycle specific approach it was possible to confirm the theory that MMS-induced γ H2AX foci are only induced during S-phase indica-

ting that MMS-induced DNA damage is arising in a replication dependent manner.

MMS-induced base methylations are repaired via base excision repair (BER), a process that involves the transient induction of DNA single-strand breaks (SSB). By analyzing XRCC1-deficient cells, which accumulate these SSBs, the process of γ H2AX foci formation after MMS treatment was characterized in more detail. After MMS treatment XRCC1-deficient cells showed strongly elevated γ H2AX foci levels indicating that SSBs induced during BER contribute to the formation of γ H2AX foci after MMS. These results are consistent with several studies demonstrating a hypersensitivity of these cell lines against alkylating agents. After MMS, a model of a replication fork run-off process can be postulated when replication forks encounter transiently induced SSBs leading to the formation of one-ended DSBs that can be visualized as γ H2AX foci. In contrast to SSBs, MMS-induced base methylations do not contribute to γ H2AX foci formation. Nevertheless, these lesions can transiently block replication forks. Although this process is normally not associated with the formation of one-ended DSBs, it does contribute to a slowdown of S-phase progression after MMS treatment. Over the last years, many different studies showed a hypersensitivity of cells with a defect in the DSB repair process homologous recombination (HR) against MMS indicating an essential role of HR in the repair of MMS-induced DNA damage. Here, this notion was confirmed by using the cell-cycle specific γ H2AX immunofluorescence analysis. The kinetics of formation and repair of γ H2AX foci after MMS treatment demonstrate that MMS-induced one-ended DSBs are determined for the HR repair process. Repairing these DSBs via non-homologous end-joining (NHEJ) is not possible, even under conditions when HR is defective. HR is not only important for the repair of replication dependent DSBs. Previous studies in our group revealed an essential role of HR for the repair of heterochromatin-associated DSBs induced by ionizing radiation in the G2 phase. Here, the genetic requirements of these two distinct sub-pathways of HR were compared by analyzing the γ H2AX kinetics in different mutant cell lines. The results show that the kinase ATM and the nuclease Artemis are essential factors for the HR-dependent repair of heterochromatic DSBs in G2 phase, whereas both proteins are dispensable for the repair of MMS-induced one-ended DSBs during S phase. This demonstrates that the two HR pathways show differences in the factors involved.

Base methylations and replication-associated one-ended DSBs have an impact on the cell-cycle behavior after MMS treatment. By FACS analysis, a MMS-mediated slowdown in S-phase progression and a prolonged cell-cycle arrest in late S/G2-phase were observed. The G2/M-checkpoint seems to be very efficient after MMS treatment because there were no additional γ H2AX foci detected in mitotic cells after MMS. Furthermore, different cell-cycle stages in S and G2 phase were analyzed in this study and the results indicate that MMS-treated cells stay in a late stage of S phase until most of the MMS-induced one-ended DSBs are repaired. In contrast to this, HR deficient cells were able to progress to G2 phase with elevated levels of persisting DSBs. The molecular base for this different behavior of wildtype and HR-deficient cells is not clear yet and will be further investigated.

2 Einleitung

2.1 Schädigende Einflüsse auf die DNA

Die DNA ist der Träger der gesamten genetischen Erbinformation der Zellen. Die Bewahrung der genomischen Integrität und die korrekte Weitergabe der DNA an die Tochterzellen sind für die Zelle daher von größter Wichtigkeit. Zwar stellen Mutationen die Grundlage für die Evolution des Lebens dar, allerdings können auch schon kleinste Veränderungen der DNA im Zusammenhang mit Erbkrankheiten und der Ausbildung von Tumoren stehen.

Die DNA ist jeden Tag einer Vielzahl endogener und exogener Einflüsse ausgesetzt, die unterschiedlichste DNA-Schäden verursachen. So können die Nukleinsäuren der DNA durch chemische Reaktionen wie Oxidationen, Desaminierungen oder Alkylierungen modifiziert werden (Wyatt + Pittman 2006). Solche Basenschäden sowie spontane Basenverluste treten in jeder menschlichen Zelle bis zu 10.000 Mal pro Tag auf (Baute + Depicker 2008) und können sowohl toxische als auch mutagene Wirkungen entfalten. Das Spektrum an DNA-Schäden reicht von diesen einfachen Basenschäden über Nukleotid-Dimere und kovalente Bindungen zwischen den DNA-Strängen oder zwischen der DNA und angelagerten Proteinen bis hin zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen (Frankenberg-Schwager 1990, Sharer 2003). Dabei stellen DNA-Doppelstrangbrüche, durch die die DNA-Doppelhelix vollständig durchtrennt wird, den schwerwiegendsten DNA-Schaden dar. Sie können chromosomale Aberrationen verursachen und bereits ein einzelner, unreparierter DSB kann zum Absterben der Zelle führen (Frankenberg-Schwager + Frankenberg 1990). Zur Erhaltung der genomischen Integrität hat die Zelle daher eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen entwickelt um auf die hohe Frequenz an Schäden in der DNA zu reagieren.

2.1.1 Endogene und exogene Quellen für DNA-Schäden

Die wichtigste Quelle für endogene DNA-Schäden stellt der Zellmetabolismus dar. Hierbei entstehen zum einen reaktive Sauerstoff-Verbindungen, die sogenannten reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), welche oxidative Basenschäden (z. B. 8-Oxoguanin) verursachen. Desweiteren treten im zellulären Stoffwechsel auch Radikale auf, die zu Ionisationen in der DNA und somit zur Ausbildung von Einzelstrangbrüchen (SSBs) oder Doppelstrangbrüchen (DSBs) führen können (Barnes 2002). Daneben gibt es aber auch eine Reihe zellulärer Prozesse, die eine gezielte Induktion von DSBs beinhalten. Dazu zählen zum Beispiel die meiotische Rekombination oder Vorgänge im Immunsystem wie der Isotypenwechsel von Antikörpern (Honjo et al. 2002), die somatische Hypermutation (Reynaud et al. 2003) oder die V(D)J-Rekombination (Bassing et al. 2002, Gellert 2002). Eine weitere wichtige Quelle

spontaner DSBs stellt die Replikation dar. Replikationsgabeln können durch unterschiedliche Addukte in der DNA (z. B. Basenschäden) arretiert werden. Abhängig von der Ursache für den Replikations-Arrest stehen der Zelle mehrere Wege zur Überwindung der Blockade zur Verfügung, die in Kapitel 2.4 genauer beschrieben werden. Ist die Zelle aber über einen längeren Zeitraum nicht in der Lage die Replikations-Blockade zu beheben, kollabiert die Replikationsgabel. Dieser Prozess ist mit der Ausbildung von DSBs assoziiert (Hanada et al. 2007, Osman + Whitby 2007). Da hierbei immer nur ein einzelnes Bruchende erzeugt wird, werden diese Replikations-assoziierten DSBs als ein-endig bezeichnet. Im Gegensatz dazu besitzen Replikations-unabhängige DSBs (z. B. nach ionisierender Strahlung) immer zwei Bruchenden und gelten daher als zwei-endig. Das Vorhandensein oder Fehlen eines zweiten Bruchendes hat dabei großen Einfluss auf die Wahl des DSB-Reparaturwegs.

Chemische Agenzien stellen eine exogene Quelle für DNA-Schäden dar. Alkylierende Agenzien wie das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Methylmethansulfonat (MMS) erzeugen alkylierte Nukleinbasen, welche die Replikation der DNA während der S-Phase stören (Wyatt + Pittman 2006). Auch kovalente Verbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen, wie sie von sogenannten *Crosslinkern* (z. B. Mitomycin C, Cis-Platin oder Senfgas) erzeugt werden, stören Replikation und Transkription (Sharer 2005). Viele weitere Agenzien entwickeln ihre schädigende Wirkung ebenfalls auf Ebene der Replikation, so auch der Polymerase-Inhibitor Aphidicolin oder der Replikations-Inhibitor Hydroxyharnstoff (HU). Durch eine Inhibition der DNA-Synthese verursachen diese Stoffe ein Arretieren und Kollabieren von Replikationsgabeln und führen damit indirekt zur Ausbildung Replikations-assoziiierter DSBs (Hanada et al. 2007). Andere Chemikalien wie der Topoisomerase-Hemmstoff Etoposid induzieren dagegen direkt DSBs, unabhängig von der Replikation (Chen + Liu 1994, Quennet et al. 2011).

Eine der wichtigsten exogenen Quellen für eine Schädigung der DNA ist ionisierende Strahlung, wie sie bei radioaktiven Zerfallsprozessen auftritt oder in einer Röntgenröhre erzeugt wird. Die strahlenphysikalischen Grundlagen ionisierender Strahlung und ihrer Wechselwirkung mit Materie werden im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

2.1.2 Strahlenphysikalische Grundlagen

2.1.2.1 Ionisierende Strahlung und ihre Wechselwirkung mit Materie

Als ionisierende Strahlung werden die Arten von Strahlung bezeichnet, die in der Lage sind Orbitalelektronen aus Atomen oder Molekülen zu lösen. Dabei kann diese Strahlung als elektromagnetische Welle (Photonen) oder als Teilchenstrahlung auftreten. Zu den elektromagnetischen Wellen zählen Röntgen- und γ -Strahlung, aber auch kurzwellige UV-Strahlen können ionisierend wirken. Zur Teilchenstrahlung gehören dagegen α -Teilchen, Elektronen,

Protonen, Neutronen oder Schwer-Ionen. Die ionisierende Eigenschaft dieser Strahlenarten ist auf ihre hohe kinetische Energie (bei Teilchen) bzw. Quantenenergie (bei Photonen) zurückzuführen. Das unterscheidet sie von anderen Arten elektromagnetischer Wellen wie Radio- und Mikrowellen oder dem sichtbaren Licht, die eine zu geringe Energie besitzen um Elektronen aus einem Atom zu lösen. In der vorliegenden Arbeit wurde stets konventionelle Röntgenstrahlung als ionisierende Strahlenart eingesetzt. Bei der Wechselwirkung mit Materie können die Photonen auf ein Orbitalelektron aus den Atomhüllen der Materie treffen und dabei einen Teil ihrer Energie auf dieses Elektron übertragen. Dadurch wird das Elektron aus seiner Atomhülle geschleudert und ein sogenanntes Sekundärelektron entsteht, welches nun selbst noch ausreichend Energie besitzt, um weitere Ionisationen durchzuführen. Abhängig von der Quantenenergie des Photons können dabei unterschiedliche Formen an Wechselwirkungen mit der Materie auftreten. Hier wird zwischen dem Photoelektrischen Effekt, dem Compton-Effekt und dem Paarbildungseffekt unterschieden, die in Abb.2.1 dargestellt sind.

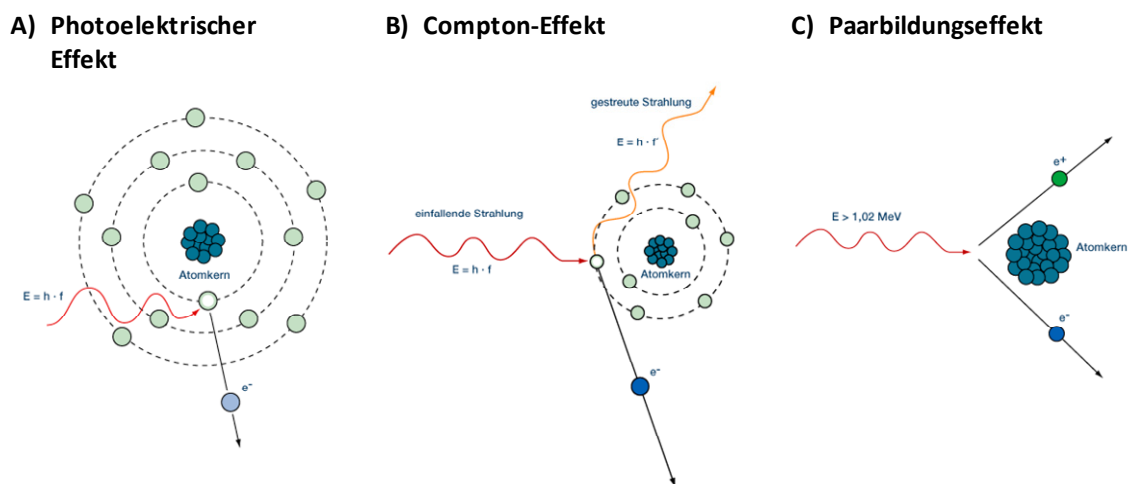


Abb.2.1: Prozesse der Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie

(A) Photoelektrischer Effekt: Ein Orbitalelektron eines Atoms wird von einem Photon getroffen und aus der Atomhülle gelöst. Die Quantenenergie E des Photons ist dabei definiert als das Produkt aus der Frequenz f und dem Planck'schen Wirkungsquantum h und wird komplett auf das entstehende Sekundärelektron übertragen. Dieses besitzt nun die Energie des Photons abzüglich seiner Bindeenergie und kann weitere Ionisations-Ereignisse auslösen. Der Photoelektrische Effekt dominiert bei Quantenenergien $< 0,5 \text{ MeV}$. (B) Compton-Effekt: Das einfallende Photon trifft ein Orbitalelektron und löst dieses aus der Atomhülle, wobei es aber nur einen Teil seiner Quantenenergie auf das entstehende Sekundärelektron überträgt. Das Photon selbst wird gestreut, bewegt sich mit einer geringen Energie weiter und kann weitere Ionisationen hervorrufen. Dieser Prozess tritt vor allem in einem Energiebereich von $0,5 - 1 \text{ MeV}$ auf. (C) Paarbildungseffekt: Bei sehr hohen Quantenenergien ($> 1,02 \text{ MeV}$) kann sich ein Photon unter dem Einfluss des Kernfeldes in ein Elektron (e^-) und ein Positron (e^+) materialisieren. Die dabei entstehenden Teilchen können über sehr hohe kinetische Energien verfügen und weitere Ionisations-Ereignisse auslösen. (modifiziert nach www.onmeda.de/lexika/strahlenmedizin)

Der Photoelektrische Effekt dominiert bei niederenergetischer Röntgenstrahlung ($< 0,5$ MeV). Hierbei überträgt das Photon seine gesamte Energie auf ein Elektron, welches daraufhin aus der Elektronenhülle gelöst wird. Die kinetische Energie dieses Sekundärelektrons entspricht der Quantenenergie des Photons abzüglich der Bindeenergie des Elektrons. Bei hochenergetischer Röntgenstrahlung ($0,5 - 1$ MeV) tritt hauptsächlich der Compton-Effekt auf, bei dem das Photon nur einen Teil seiner Energie für die Freisetzung eines Hüllelektrons verwendet. Im Gegensatz zum Photoelektrischen Effekt wird das Photon hier nicht vollständig absorbiert, sondern bleibt erhalten. Es wird lediglich abgelenkt und kann mit seiner verminderten Restenergie weitere Ionisationen verursachen. Bei sehr hohen Quantenenergien der Photonen (> 1 MeV) tritt der Paarbildungseffekt auf. Dabei kommt es unter dem Einfluss des Kernfeldes zu einer Materialisierung des Photons in ein Elektron und ein Positron, welche über sehr hohe kinetische Energien verfügen können (Hall + Giaccia 2006). Bei der in dieser Arbeit eingesetzten 90-kV-Röntgenstrahlung tritt ein solcher Prozess nicht auf, hier dominieren der Photoelektrische und der Compton-Effekt. Da die Sekundärelektronen, die bei diesen Prozessen entstehen, neue Ionisationen auslösen können, wird die biologische Wirkung von Röntgenstrahlung nicht allein durch die Photonen sondern auch durch die Sekundärelektronen bestimmt.

Ein quantitatives Maß für die in der Materie deponierte Energie stellt die Energiedosis D dar. Diese ist definiert als die mittlere von der Strahlung an ein Volumenelement Masse abgegebene Energie und wird in der Einheit „Gray“ (Gy) angegeben.

2.1.2.2 Direkter und indirekter Strahleneffekt

Schon vor einigen Jahrzehnten wurde die DNA als die strahlenempfindliche Komponente der Zelle identifiziert (Munro 1970). Bei der Wechselwirkung von Photonen mit der DNA unterscheidet man zwischen dem direkten und dem indirekten Strahleneffekt (Abb.2.2). Bei einem direkten Strahleneffekt wechselwirkt ein Photon oder ein durch das Photon erzeugtes Sekundärelektron direkt mit der DNA. Dadurch werden die Atome der DNA direkt ionisiert, was zum Aufbrechen chemischer Bindungen im DNA-Molekül führt. Der indirekte Strahleneffekt beruht dagegen hauptsächlich auf einer Reaktion der Photonen mit Wassermolekülen, die den Großteil des zellulären Milieus ausmachen. Bei der Ionisation von Wassermolekülen entstehen unterschiedliche Radikale, von denen vor allem die Hydroxyl-Radikale ($\text{OH}\cdot$) besonders reaktiv sind. Aufgrund dieser hohen Reaktivität sind Hydroxyl-Radikale sehr kurzlebig und haben nur eine sehr geringe Reichweite. Daher sind nur die Radikale, die in räumlicher Nähe zur DNA erzeugt werden, potentiell in der Lage diese zu schädigen (Goodhead 1994). Der direkte Strahleneffekt tritt vor allem bei Strahlungsarten mit einem hohen Linearen Energie-Transfer (LET) auf, zu denen zum Beispiel α -Teilchen oder Neutronen zählen. Bei Strahlungsarten mit niedrigen LET, zu denen die Röntgenstrahlung zählt,

beruht die DNA-schädigende Wirkung hauptsächlich auf dem indirekten Strahleneffekt (Hall + Giaccia 2006).

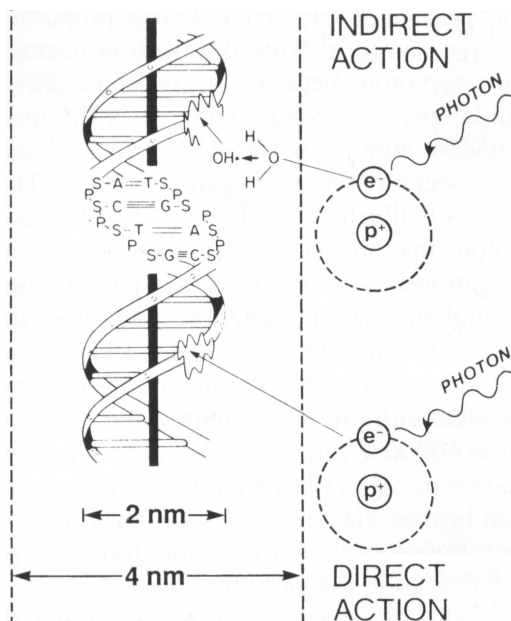


Abb.2.2: Direkter und indirekter Strahleneffekt ionisierender Strahlung

Treffen Photonen auf Materie, können sie zu Ionisationen führen, indem sie Orbitalelektronen aus der Atomhülle schleudern. Dabei entstehen Sekundärelektronen, welche weitere Ionisations-Ereignisse auslösen können. Beim direkten Strahleneffekt (unten) erfolgt diese Ionisation direkt an der DNA, beim indirekten Strahleneffekt (oben) reagieren die Sekundärelektronen dagegen mit anderen Verbindungen. In der Zelle ist dies v.a. Wasser. Dadurch werden hochreaktive Radikale (v. a. Hydroxyl-Radikale) gebildet, die die DNA nun wiederum selbst schädigen können. Es wird angenommen, dass Radikale, die in einem Zylinder mit einem Durchmesser von 4 nm um die DNA entstehen, Ionisationen im DNA-Molekül auslösen können.

Abkürzungen: S = Zucker, P = Phosphatgruppe, A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin (Hall + Giaccia, 2006)

2.1.2.3 Strahleninduzierte DNA-Schäden

Röntgenstrahlung induziert zwar ein breites Spektrum an Schäden in der DNA, diese sind für die Zelle aber von unterschiedlicher Relevanz. So können durch Radikale erzeugte Basenschäden und SSBs von der Zelle sehr schnell und effektiv behoben werden. Sie haben daher keinen Einfluss auf das zelluläre Überleben (Ward 1995). Eine genaue Abschätzung der Frequenz der unterschiedlichen Schäden ist schwierig und die Angaben schwanken zwischen verschiedenen Publikationen. Grob kommen auf jeden strahleninduzierten DSB etwa 25 SSBs und 75 Basenschäden (Ward et al. 2000). DSBs stellen somit ein eher seltenes Ereignis dar und ihre Ausbildung steht im Zusammenhang mit der inhomogenen Energiedeposition von Photonen und Sekundärelektronen. Diese geben zum Teil sehr große Energiemengen in einem eng begrenzten Bereich ab, wodurch lokal eine hohe Konzentration an Hydroxyl-Radikalen erzeugt wird. Dadurch kann es zu einer lokal begrenzten Anhäufung an DNA-Schäden kommen, die als *locally multiply damaged site* (LMDS) bezeichnet wird und bis zu 20 bp umfassen kann (Hall + Giaccia 2006). In solchen LMDS kommt es zur Ausbildung eines DSBs, wenn in diesem Bereich zwei SSBs in den gegenüberliegenden DNA-Strängen erzeugt werden.

2.2 Zelluläre Schadensantwort auf DNA-Doppelstrangbrüche

Das Auftreten von DSBs in einer Zelle löst vielfältige Signalkaskaden aus, an denen eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine beteiligt ist und die durch einen hierarchischen Ablauf von Phosphorylierungen gekennzeichnet sind. Die komplexen Zusammenhänge dieser Kaskaden und die beteiligten Faktoren sind noch nicht vollständig aufgeklärt, im Wesentlichen werden durch dieses Signalnetzwerk aber drei Reaktionswege eingeleitet. Zunächst wird eine Reihe von Reparaturfaktoren aktiviert, um die aufgetretenen Schäden zu beheben. Zur Reparatur von DSBs stehen der Zelle dabei zwei getrennte Reparaturwege zur Verfügung, die Nichthomologe Endverknüpfung (*non-homologous end-joining*, NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR). Desweiteren ist die Zelle in der Lage bei massiven Schäden einen Zellzyklus-Arrest einzuleiten. Dadurch wird den Reparaturprozessen zum einen mehr Zeit zur Behebung aller Schäden zur Verfügung gestellt, zum anderen wird so verhindert, dass die Zelle mit zu vielen Schäden in die nächste Zellzyklusphase gelangt, was letztendlich zur Entstehung chromosomaler Aberrationen führen könnte. Als letzten Ausweg besitzt die Zelle zudem die Möglichkeit den programmierten Zelltod einzuleiten, wenn die Schädigung der DNA zu gravierend ist (Khanna + Jackson 2001, Jeggo + Löbrich 2006).

2.2.1 Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen

Eine zentrale Bedeutung im komplexen Signalsystem der DNA-Schadensantwort nehmen die beiden Proteinkinasen ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ATM and Rad3 related*) ein, die zur Familie der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-ähnlichen Kinasen (PIKK) zählen. Ein weiterer wichtiger Vertreter dieser Familie von Serin/Threonin-Kinasen ist die DNA-PKcs, die eine Kernkomponente des NHEJ darstellt. ATM und ATR sind in der Lage eine Vielzahl von Proteinen zu phosphorylieren und übernehmen damit wesentliche Funktionen bei der Einleitung von Signalwegen und der Rekrutierung von Reparaturfaktoren (Kim et al. 1999, Abraham 2001).

Die Bedeutung der beiden Kinasen wird in ATM- und ATR-defizienten Zelllinien deutlich. Mutationen im *ATM*-Genlocus verursachen die Krankheit *Ataxia Telangiectasia* (AT), welche sich neben den namensgebenden Ataxien (Gleichgewichtsstörungen) und Telangiektasien (spinnenartige Erweiterungen oberflächiger Blutgefäße) unter anderem durch Immundefekte und eine erhöhte Prädisposition für Krebs auszeichnet (Taylor et al. 1996, Jeggo + Löbrich 2005). Zudem zeigen die Zellen eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit und einen Defekt in der Zellzykluskontrolle. Eine Krankheit, bei der eine Mutation im *ATR*-Gen auftritt, ist das Seckel-Syndrom, das unter anderem durch ein vermindertes Wachstum und eine geistige Retardierung gekennzeichnet ist. Hier wird aufgrund einer Punktmutation und eines damit verbundenen veränderten Splice-Verhaltens nur eine geringe Menge an funktionalem ATR

exprimiert (O'Driscoll et al. 2003). Eine Krankheit, bei der ATR vollständig inaktiv vorliegt, ist nicht bekannt und in Mäusen sind Nullmutationen von ATR embryonal letal (Brown + Baltimore 2000, Shechter et al. 2004b). ATR scheint somit von essentieller Bedeutung für die Lebensfähigkeit von Zellen zu sein.

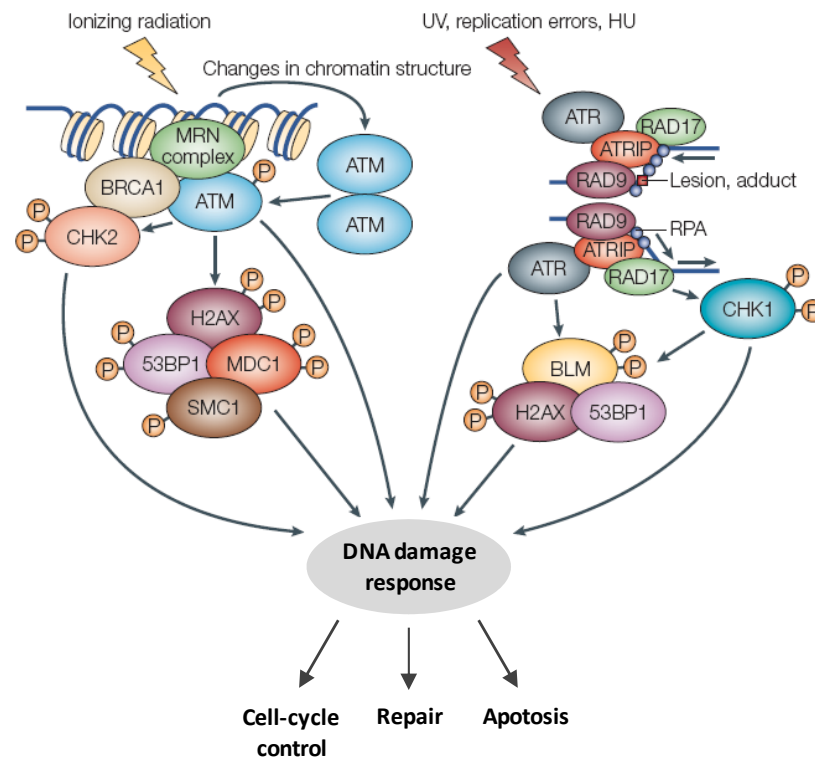


Abb.2.3: Initiale Aktivierungsereignisse von ATM und ATR nach DNA-Schädigung

Die beiden Proteinkinasen ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ATM and Rad3 related*) werden durch unterschiedliche DNA-Schäden aktiviert. Während ATM hauptsächlich an der zellulären Schadensantwort nach Induktion von DSBs beteiligt ist (links), wird ATR durch replikativen Stress aktiviert (rechts). Durch das Auftreten eines DSBs kommt es zu lokalen Veränderungen in der Chromatinstruktur, die ein Aktivierungssignal für ATM darzustellen scheinen. ATM liegt in der Zelle in inaktiver Form als Dimer vor, das nach einer Autophosphorylierung in zwei aktive Monomere gespalten wird. Ein DSB wird initial vom MRN-Komplex (bestehend aus MRE11, Rad50 und NBS1) erkannt und das aktivierte ATM wird an diesen Komplex rekrutiert. Die Phosphorylierung des Histons H2AX (als γ H2AX bezeichnet) durch ATM stellt eine wichtige Reaktion der Schadensantwort dar. Durch eine Verstärkungskaskade über die ebenfalls von ATM phosphorylierten Mediatorproteine MDC1 und 53BP1 wird die H2AX-Phosphorylierung über einen großen Bereich um den DSB ausgebreitet und dient als Signal für weitere Faktoren der DNA-Schadensantwort. Bei Störungen der Replikation wird ATR in einem Komplex mit ATRIP (*ATR interacting protein*) zur Replikationsgabel rekrutiert. Das Signal für diese Rekrutierung stellen dabei die einzelsträngigen DNA-Bereiche an der Replikationsgabel dar, die mit RPA (*replication protein A*) beladen vorliegen. Die Erkennung dieser Bereiche wird durch einen Komplex aus Rad9, Rad1 und Hus1 (in der Abbildung als Rad9 bezeichnet) und durch den Beladungsfaktor Rad17 erleichtert. ATR phosphoryliert daraufhin H2AX und andere Faktoren wie z. B. die Checkpoint-Kinase Chk1. ATM und ATR besitzen ein breites Spektrum an Zielproteinen und zeigen dabei teilweise Substratüberlappungen. Obwohl sie durch unterschiedliche Schadensereignisse aktiviert werden, können sie so die gleichen Signalwege initiieren, an deren Ende die Aktivierung von Zellzykluskontroll-Mechanismen (vermittelt über Chk1 und Chk2), die Einleitung von DNA-Reparaturprozessen oder die Apoptose stehen. (modifiziert nach Segupta + Harris 2005)

Die Phosphorylierungen durch ATM und ATR erfolgen in einer konservierten Aminosäure-Sequenz, dem sogenannten S/TQ-Motiv, welches in vielen Faktoren der zellulären DNA-Schadensantwort nachgewiesen wurde. Dadurch haben ATM und ATR zu einem großen Teil die gleichen Zielproteine und können sich zumindest teilweise kompensieren (Cliby et al. 1998, Matsuoka et al. 2007). Der große Unterschied in den Funktionen von ATM und ATR liegt in der Art ihrer Aktivierung. Während ATM in allen Zellzyklus-Phasen an der DSB-Schadensantwort beteiligt ist, wird ATR vor allem durch replikativen Stress aktiviert (Abb.2.3) (Shechter et al. 2004b).

Der genaue Prozess der Aktivierung von ATM wurde noch nicht aufgeklärt, man geht aber davon aus, dass Veränderungen in der Chromatinstruktur nach der Induktion eines DSBs ein Signal für die ATM-Aktivierung darstellen können (Bakkenist + Kastan 2003). ATM liegt in der Zelle als inaktives Homodimer vor. Nach Induktion eines DSBs kommt es zu einer Autophosphorylierung von ATM an Serin 1981, wodurch das Dimer in zwei aktive ATM-Monomere dissoziiert (Bakkenist + Kastan 2003). Zu den ersten Faktoren, die an einen DSB akkumulieren, gehören die Proteine des MRN-Komplexes bestehend aus MRE11 (*meiotic recombination 11*), Rad50 (*radiation 50*) und NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*) (Uziel et al. 2003, Lukas et al. 2004). Vermittelt durch ein DNA-Bindemotiv von MRE11 lagert sich der Komplex an die beiden Enden eines DSBs an (de Jager et al. 2001) und über eine Interaktion mit NBS1 wird das aktivierte ATM an den DSB rekrutiert (Lee + Paull 2005), welches nun eine Reihe von Zielproteinen phosphorylieren kann.

Eine zentrale Reaktion von ATM ist dabei die Phosphorylierung des Histons H2AX. Diese gleichmäßig über das gesamte Chromatin verteilte Histonvariante macht etwa 10 % aller H2A-Proteine aus (West + Bonner 1980) und wird im Fall eines DSBs an Serin 139 phosphoryliert (Rogakou et al. 1998). Die phosphorylierte Form dieses Histons wird als γ H2AX bezeichnet und stellt ein wichtiges Signal für die Rekrutierung anderer Reparaturfaktoren dar (Paull et al. 2000). So lagert sich das Mediatorprotein MDC1 (*mediator of damage control 1*) an γ H2AX an (Stucki et al. 2005, Lou et al. 2006) und kann nun weitere MRN-Komplexe rekrutieren. Über diese werden weitere aktive ATM-Monomere an den Schaden rekrutiert, wodurch weitere H2AX-Moleküle phosphoryliert werden. So kommt es zu einer positiven Verstärkungsreaktion, durch die das γ H2AX-Signal über einen Bereich von mehreren Megabasenpaaren um den Schaden ausgebreitet wird (van Attikum + Gassner 2009, Jungmichel + Stucki 2010). Neuere Studien zeigen, dass auch Ubiquitinierungs-Reaktionen bei diesem Prozess von großer Bedeutung sind (Stewart et al. 2009, Lukas et al. 2011). Der Bereich des phosphorylierten H2AX um einen DSB kann mittels phosphospezifischer Antikörper im Immunfluoreszenzmikroskop als sogenannter γ H2AX-Focus sichtbar gemacht werden. Diese Methode der γ H2AX-Immunfluoreszenz ermöglicht die Detektion von DSBs und hat sich in den letzten Jahren zu einer Standardmethode zur Untersuchung des DSB-Reparaturverhaltens entwickelt (Löbrich et al. 2010).

Im Gegensatz zu ATM wird ATR nicht direkt durch DSBs aktiviert sondern durch einzelsträngige DNA-Bereiche (ssDNA), die mit RPA (*replication protein A*) beladen sind (Shechter et al. 2004b). Diese ssDNA-Bereiche treten verstärkt an arretierten Replikationsgabeln oder bei der Resektion von DSBs auf. ATR liegt in einem Komplex mit ATRIP (*ATR interacting protein*) vor, das die Interaktion von ATR mit ssDNA-gebundenem RPA vermittelt und so die ATR-abhängige Phosphorylierung von Zielproteinen wie der Checkpoint-Kinase Chk1 stimuliert (Zou + Elledge 2003). Nach der Rekrutierung an eine Replikationsgabel kann ATR verschiedene Substrate wie H2AX phosphorylieren. Eine ATR-abhängige H2AX-Phosphorylierung kann dabei nicht nur nach replikativem Stress sondern auch in unbehandelten S-Phase-Zellen detektiert werden (Löbrich et al. 2010). Dies spricht dafür, dass ATR auch während der normalen S-Phase-Progression aktiviert wird. Konsistent hiermit wird für ATR eine generelle regulatorische Funktion während der S-Phase angenommen (Shechter et al. 2004a). Eine verstärkte ATR-Aktivierung nach exogen induziertem Replikationsstress ist dagegen auf die verstärkte Ausbildung RPA-beladener ssDNA-Bereiche zurückzuführen (Shechter et al. 2004b).

2.2.2 Mechanismen der Zellzykluskontrolle

In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente durchgeführt, in denen das Zellzyklusverhalten von Zellen nach einer DNA-Schädigung untersucht wurde. Diese Untersuchungen wurden dabei nur begleitend zu Reparaturstudien durchgeführt, auf denen der Schwerpunkt dieser Arbeit lag. Daher soll hier nur auf die wichtigsten Grundlagen der Zellzykluskontrolle eingegangen werden. Eine detaillierte Beschreibung der zellulären Reparaturprozesse für unterschiedliche DNA-Schäden folgt in den Kapiteln 2.3 und 2.4.

Der Zellzyklus kann in vier Zellzyklus-Phasen eingeteilt werden: die G1-, die S- und die G2-Phase sowie die Phase der Mitose (Abb.2.4) (Sisken + Morasca 1965). Während die G1- und G2-Phase vor allem durch ein Wachstum der Zelle geprägt sind, erfolgt während der S-Phase die Verdopplung der DNA durch die Replikation. Während der Mitose teilt sich die Zelle. Die Übergänge der einzelnen Zellzyklus-Phasen werden reguliert durch ein komplexes Zusammenspiel von Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDK) und ihren regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen. Diese Proteine werden Zellzyklus-spezifisch exprimiert und je ein definierter Cyclin/CDK-Komplex ist verantwortlich für die Progression durch eine Zellzyklus-Phase bzw. für den Übertritt in die nächste Phase. Dies wird durch die Phosphorylierung unterschiedlicher Zielproteine erreicht, wodurch spezifische Signalwege aktiviert werden (Deckbar et al. 2011).

Das grundlegende Prinzip der Zellzykluskontrolle basiert nun auf der Möglichkeit der Zelle, die Zellzyklus-Progression an definierten Kontrollpunkten innerhalb des Zellzyklus, den sogenannten *Checkpoints*, anzuhalten (Abb.2.4). Dies ist am Übergang von der G1- in die S-

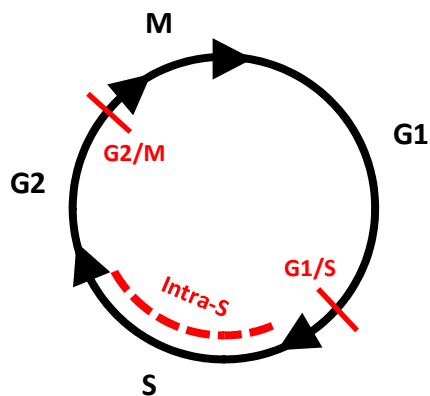


Abb.2.4: Schematische Darstellung des Zellzyklus

Der Zellzyklus kann in vier Phasen eingeteilt werden. Die G1- und die G2-Phase sind geprägt von einem Wachstum der Zellen und von der Synthese von Proteinen, die in den darauffolgenden Zellzyklus-Phasen benötigt werden. Während der S-Phase findet die Verdopplung der DNA durch die Replikation statt und in der Mitose (M) erfolgt die Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen. Beim Auftreten von DNA-Schäden kann die Zelle einen Zellzyklus-Arrest am G1/S- oder am G2/M-Checkpoint einleiten (dargestellt als rote Balken). Zudem ist sie in der Lage die Progression durch die S-Phase zu verlangsamen (Intra-S-Checkpoint).

Phase (G1/S-Checkpoint) und von der G2-Phase in die Mitose (G2/M-Checkpoint) möglich (Deckbar et al. 2011). Darüber hinaus gibt es einen Intra-S-Checkpoint (Bartek et al. 2004). Hier wird die Progression der S-Phase aber nicht komplett arretiert sondern nur verlangsamt. Erreicht wird dies zum einen durch eine Verlangsamung der Elongation der Replikation an bereits aktiven Replikationsgabeln (Shechter et al. 2004b). Zum anderen wird die Initiation weiterer Replikationsgabeln unterbunden (Donzelli + Draetta 2003, Sorensen et al. 2003). Die Aktivierung der Zellzykluskontrolle erfolgt, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, durch die Kinasen ATM und ATR und steht in engem Zusammenhang mit der DNA-Schadensantwort. Wichtige Zielproteine von ATR und ATM sind dabei die beiden Checkpoint-Kinasen Chk1 und Chk2. Diese können dann durch weitere Phosphorylierungs-Reaktionen andere Zellzyklus-Faktoren inhibieren, was letztlich in einer Inaktivierung von Cyclin/CDK-Komplexen resultiert (van den Heuvel + Harlow 1993).

2.3 DSB-Reparaturprozesse

Einer eukaryotischen Zelle stehen zwei unabhängige Reparaturwege zur Behebung von DSBs zur Verfügung: die Nichthomologe Endverknüpfung (*non-homologous end-joining*, NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR) (Abb.2.5). Das NHEJ beschreibt den Prozess einer direkten Verknüpfung zweier Bruchenden, die unabhängig von der Sequenz des geschädigten Bereichs erfolgt (Weterings + van Gent 2004). Dieser Prozess ist allerdings nicht fehlerfrei, da er zum einen die Gefahr einer Verknüpfung von falschen Bruchenden birgt, was zur Ausbildung chromosomaler Translokationen führen kann. Zum anderen können die Bruchenden Schäden oder chemische Modifikationen aufweisen, die eine direkte Ligation verhindern. Solche komplexeren DSB-Enden erfordern eine kurze Prozessierung, infolge derer einige Basen an den Enden abgebaut werden (Pfeiffer et al. 2004). Daher wird

der Vorgang des NHEJ häufig von kurzen Sequenz-Deletionen im Bereich des DSBs begleitet. Im Gegensatz dazu stellt die HR einen fehlerfreien Reparatur-Mechanismus dar, der auf der Verwendung von Sequenz-Informationen homologer Bereiche beruht. Durch einen DSB beschädigte oder zerstörte DNA-Sequenzen können dabei anhand der Informationen in einem homologen DNA-Bereich wiederhergestellt werden. Dies erfolgt hauptsächlich durch die Verwendung von homologen Bereichen auf der unbeschädigten Schwesterchromatide (Kadyk + Hartwell 1992). Es wird vermutet, dass die räumliche Nähe der Schwesterchromatiden, die durch Cohesin-Komplexe zusammengehalten werden, diesen Prozess begünstigt (Nasmyth + Haering 2009). Zwar können potentiell auch Sequenzen auf dem homologen Chromosom dafür herangezogen werden, jedoch ist dieser Prozess in Säugern stark unterdrückt (Takata et al. 1998, Johnson + Jasin. 2001). Dadurch ist die HR in Säugern auf die Zellzyklus-Phasen begrenzt, in denen die Chromosomen mit zwei Schwesterchromatiden vorliegen (S- und G2-Phase) (Rothkamm et al. 2003).

Im Gegensatz zu Niederen Eukaryoten (z. B. Hefen), in denen die HR den Hauptreparaturweg darstellt, ist das NHEJ der dominierende Reparaturmechanismus in Säugern (Wang et al. 2001). Dies ist unter anderem auf die Beschränkung der HR auf die S- und G2-Phase zurückzuführen. In diesen Phasen scheinen sich HR und NHEJ teilweise gegenseitig zu unterdrücken, sie besitzen aber auch überschneidende Funktionen und können sich somit zum Teil kompensieren. So wurde beispielsweise in NHEJ-defizienten Hamsterzellen eine im Vergleich zu Wildtyp-Zellen deutlich erhöhte HR-Rate detektiert (Allen et al. 2002). Eine vollständige Kompensation ist aber nicht möglich, denn eine Defizienz in einem der beiden Reparaturwege wird fast immer von einer Beeinträchtigung des zellulären Überlebens begleitet (Rothkamm et al. 2003). Somit scheint es in der S- und der G2-Phase Schäden zu geben, die für einen der beiden Reparaturmechanismen determiniert sind. Faktoren, die in der G2-Phase die Wahl des Reparaturwegs beeinflussen, scheinen unter anderem die Struktur der Bruchenden und die Lokalisation der Schäden im Eu- oder Heterochromatin zu sein (Shibata et al. 2011). Die grundlegenden Abläufe von NHEJ und HR sind in Abb.2.5 dargestellt.

2.3.1 Die Nichthomologe Endverknüpfung

Eine Hauptkomponente des NHEJ ist die DNA-PK, ein DNA-abhängiger Proteinkinase-Komplex, der auch bei der Aufrechterhaltung von Telomer-Enden und der Einleitung der Apoptose eine Rolle spielt (Burma + Chen 2004). Die regulatorische Untereinheit der Kinase wird aus einem Heterodimer der Proteine Ku70 und Ku80 gebildet, das DNA-Enden ungeachtet ihrer Sequenz erkennt und innerhalb von Sekunden nach der Induktion eines DSBs an die Bruchenden bindet (Uematsu et al. 2007). Strukturanalysen haben gezeigt, dass das Ku70/Ku80-Heterodimer dabei eine Art Ring um die DNA-Enden ausbildet (Walker et al. 2001). Dies hat zum einen die Funktion die Bruchenden vor Prozessierungs- oder

Degradationsprozessen zu schützen (Weterings et al. 2003). Zum anderen rekrutiert der Ku70/Ku80-Komplex die katalytische Untereinheit der DNA-PK, die DNA-PKcs, welche, wie auch die Proteinkinasen ATM und ATR, zur Familie der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-ähnlichen Kinasen zählt (Lees-Miller et al. 1990). *In vitro* wurde eine Reihe potentieller Substrate für eine Phosphorylierung durch die DNA-PKcs identifiziert (z. B. Ku70/Ku80, XRCC4, Artemis und die DNA-PKcs selbst), für viele dieser Phosphorylierungen wurde eine Relevanz *in vivo* aber noch nicht bestätigt (Weterings + Chen 2007).

Durch die Rekrutierung der DNA-PKcs bildet sich eine Struktur bestehend aus zwei Bruchenden, zwei Ku70/Ku80-Dimeren und zwei DNA-PKcs-Molekülen aus, wobei letztere eine direkte Verbindung zwischen den beiden Bruchenden darstellen (Abb.2.5) (Weterings + Chen 2007). Innerhalb dieses Komplexes kommt es nun zu einer Autophosphorylierung der DNA-PKcs in *trans* an Serin 2056 (Meek et al. 2007), was zu einer Konformationsänderung des DNA-PK-Holoenzym führt, infolge derer die Bruchenden frei werden (Ding et al. 2003, Weterings et al. 2003, Uematsu et al. 2007). Eine Phosphorylierung eines weiteren Serin-Restes durch ATM scheint für diesen Prozess ebenfalls wichtig zu sein (Chen et al. 2007). Die Bruchenden werden dadurch zugänglich für Prozessierungsfaktoren, die bei einer komplexen Schädigung einige Basen entfernen und die Bruchenden in eine ligierbare Form bringen (Goodarzi et al. 2006). Außerdem können sich nun auch weitere NHEJ-Faktoren an den Bruchenden anlagern (Weterings + Chen 2007).

Die abschließende Ligation der zueinander ausgerichteten Bruchenden erfolgt durch die DNA-Ligase IV (LigIV), die in einem Komplex mit dem Protein XRCC4 vorliegt, das eine stabilisierende Funktion in diesem Komplex zu haben scheint (Wang et al. 2005, Jeggo + Löbrich 2005). Vor Kurzem wurde ein weiterer Faktor beschrieben, welcher die Ligation der Bruchenden durch LigIV unterstützt. Das Protein, das parallel von zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen identifiziert wurde, wird als XLF (*XRCC4-like factor*) bzw. Cernunnos bezeichnet (Ahnesorg et al. 2006, Buck et al. 2006). XLF-defiziente Zellen zeigen eine deutliche Einschränkung in der Reparatur von DSBs in der G1-Phase (Beucher et al. 2009), die genaue Funktion dieses Faktors im NHEJ ist aber noch unklar.

Über den Weg des NHEJ können sowohl DSBs mit glatten als auch mit überhängenden Bruchenden verbunden werden. Bei überhängenden Enden wird dies durch ein Auffüllen der fehlenden Bereiche oder durch eine Resektion des Überhangs möglich (Weterings + Chen 2007). Nach ionisierender Strahlung treten oft komplexere Bruchenden mit zusätzlichen Schäden (3'-Phosphate, Zucker- oder Basenschäden) auf (Friedberg et al. 2006). Solche komplexen Bruchenden müssen vor einer Ligation zunächst prozessiert werden. Der dabei am besten charakterisierte Faktor ist die Nuklease Artemis, die während der V(D)J-Rekombination von großer Bedeutung ist. Bei diesem Vorgang der Neuordnung variabler Bereiche von Immunglobulin-Genen treten Bruchenden mit charakteristischen Haarnadel-Strukturen auf, die ein direktes Verbinden der einzelnen Gensegmente verhindern (Bassing et al. 2002, Gellert 2002). Diese Haarnadel-Strukturen können von Artemis aufgelöst wer-

den, wodurch die Ligation der Bruchenden ermöglicht wird. Die dafür nötige Endonuklease-Aktivität von Artemis wird *in vitro* durch eine Phosphorylierung durch die DNA-PK vermittelt (Ma et al. 2002). Dies scheint auch die Situation *in vivo* widerzuspiegeln, denn DNA-PK-defiziente Zellen weisen ebenfalls einen Defekt in der Prozessierung von Haarnadel-Strukturen auf. Mutationen im Artemis-Gen äußern sich phänotypisch unter anderem in einer ausgeprägten Immundefizienz, die auf einen Defekt in der Ausbildung von Antikörpern und T-Zell-Rezeptoren zurückzuführen ist (Chang et al. 1993). Zudem weisen Artemis-defiziente Zellen eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit auf. Dieses Krankheitsbild wird mit dem Namen RS-SCID (*radiation-sensitive severe combined immune-deficiency*) beschrieben (Moshous et al. 2003).

Die Strahlenempfindlichkeit von Artemis-defizienten Zellen deutet auf eine Beteiligung von Artemis an Reparatur-Prozessen hin und in der Tat konnte in diesen Zellen ein DSB-Reparaturdefekt nach Bestrahlung in der G1-Phase detektiert werden. Hier verbleiben etwa 10 – 15 % der induzierten DSBs unrepariert, was verdeutlicht, dass Artemis nur an der Reparatur einer Subpopulation der DSBs beteiligt ist (Riballo et al. 2004). Hierbei könnte es sich um komplexe Brüche handeln, die aufgrund von Basenmodifikationen oder Haarnadel-Strukturen an den Bruchenden durch Artemis prozessiert werden müssen (Löbrich + Jeggo 2005, Wang et al. 2005). Diese Annahme wird unterstützt durch Beobachtungen, dass Artemis-defiziente Zellen nach Behandlung mit dem Topoisomerase-Inhibitor Etoposid, der hauptsächlich glatte Bruchenden erzeugt, keinen signifikanten Reparaturdefekt aufweisen (Riballo et al. 2004). Im Gegensatz dazu wird nach einer Bestrahlung mit α -Teilchen oder Kohlenstoff-Ionen, die aufgrund ihres höheren LETs komplexere DNA-Schäden induzieren als Röntgenstrahlung, eine deutliche Zunahme des Anteils Artemis-abhängiger DSBs beobachtet (Riballo et al. 2004, Ensminger GSI-Report 2010).

Interessanterweise zeigen ATM-defiziente Zellen den gleichen Reparaturdefekt nach einer Bestrahlung in der G1-Phase wie Artemis-Zellen und Epistasis-Studien bestätigen, dass ATM und Artemis Bestandteil des gleichen Reparaturwegs sind (Kühne et al. 2004). Der Nachweis einer Hyperphosphorylierung von Artemis durch ATM, die nach Bestrahlung, nicht aber während der V(D)J-Rekombination auftritt, unterstützt diese Daten (Riballo et al. 2004). Neuere Studien ergaben, dass es sich bei den ATM-abhängigen Schäden um DSBs handelt, die im Heterochromatin lokalisiert sind (Goodarzi et al. 2008, Goodarzi et al. 2010). Die in heterochromatischen Bereichen verstärkt auftretenden repetitiven Sequenzen können eventuell die Ausbildung von Haarnadel- oder anderen Sekundärstrukturen fördern, was die Abhängigkeit dieser Schäden von einer Prozessierung durch Artemis erklären könnte. Dieser für heterochromatische DSBs spezifische Reparaturdefekt in ATM- oder Artemis-defizienten Zellen tritt auch nach Röntgenbestrahlung in der G2-Phase auf (Deckbar et al. 2007). Hier werden diese ATM- und Artemis-abhängigen Brüche aber nicht über den NHEJ-Weg repariert sondern mit Hilfe der HR. Mit unterschiedlichen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass HR-defiziente Zellen den gleichen Reparaturdefekt aufweisen wie ATM- oder Artemis-

defiziente Zellen (Beucher et al. 2009). Somit ist die HR in der G2-Phase auf die Reparatur von DSBs in heterochromatischen Bereichen spezialisiert.

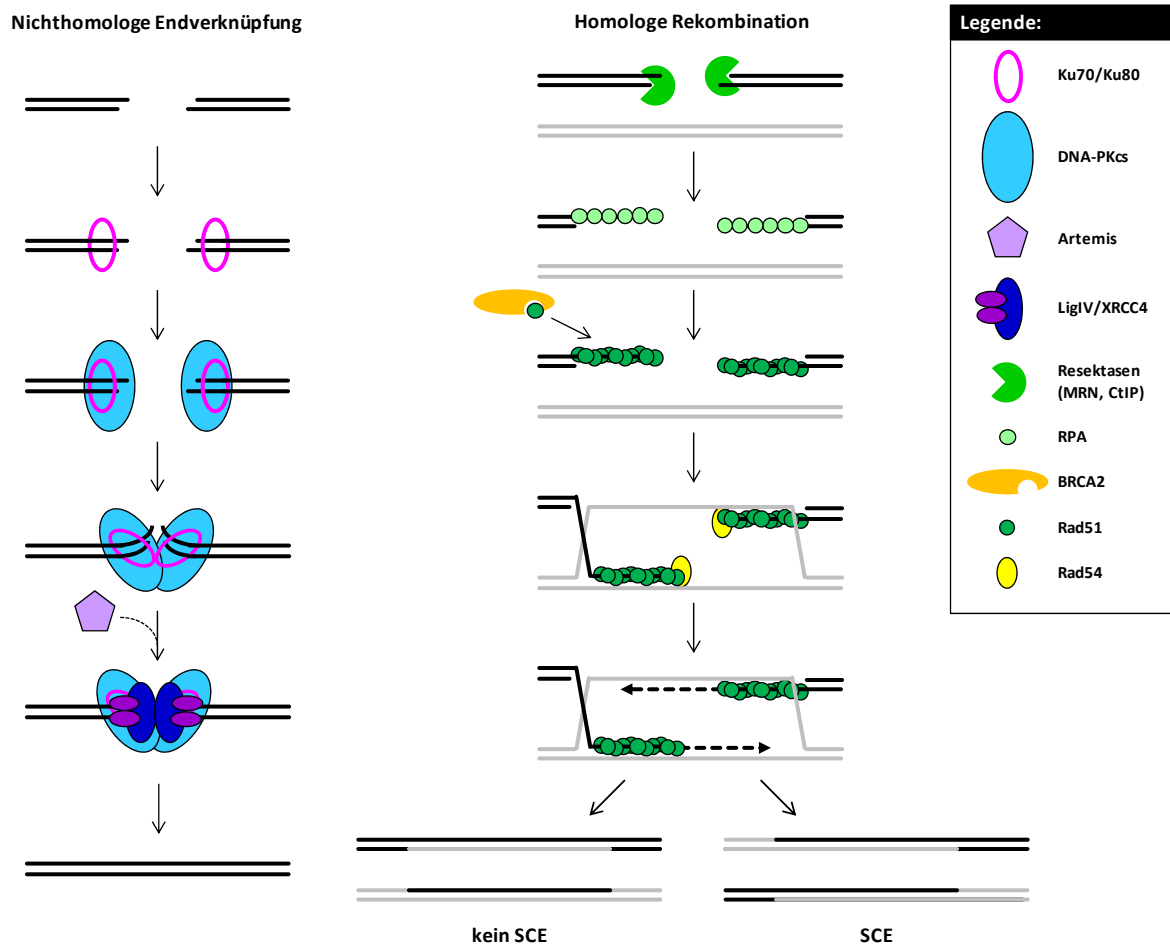


Abb.2.5: Grundlegende Prinzipien der Nichthomologen Endverknüpfung (NHEJ) und der Homologen Rekombination (HR)

Der in Säugern vorherrschende DSB-Reparaturweg ist das NHEJ (links). Dabei bindet das Ku70/Ku80-Heterodimer an die Bruchenden und rekrutiert die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs). Zusammen bilden sie das DNA-PK-Holoenzym, das die Bruchenden vor Degradation schützt und zueinander ausrichtet. Nach einer Autophosphorylierung der DNA-PKcs werden die Bruchenden zugänglich für Prozessierungsfaktoren (z. B. Artemis), die bei einer komplexen Schädigung einige Basen entfernen und die Bruchenden in eine ligierbare Form bringen. Die Ligation erfolgt durch den LigIV/XRCC4-Komplex und wird durch den Faktor XLF (graphisch nicht dargestellt) gefördert.

Der initiale Schritt der HR (rechts) ist eine Resektion der beiden 5'-Enden des DSBs, wodurch an den 3'-Enden ein längerer Bereich ssDNA entsteht, an den sich RPA anlagert. An diesem Prozess können verschiedene Proteine beteiligt sein, die hier unter dem Begriff „Resektasen“ zusammengefasst sind. Katalysiert durch BRCA2 wird RPA an den Bruchenden durch Rad51 ersetzt und es bildet sich das Rad51-Nukleoproteinfilament. Bei dem als Stranginvasion bezeichneten Prozess wandert nur ein Rad51-Nukleoproteinfilament in den homologen Bereich ein und verdrängt dabei den zweiten DNA-Strang, der nun wiederum mit dem anderen resektierten Bruchende paaren kann. Die Helikase Rad54 unterstützt diesen Prozess. Durch Polymerasen werden die DSB-Enden nun anhand der komplementären DNA-Stränge der Schwesterchromatide verlängert, bis die fehlenden Bereiche aufgefüllt sind. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer doppelten Holliday-Struktur, deren Auflösung über verschiedene Prozesse erfolgen kann, die teilweise zur Ausbildung von Schwesterchromatid-Austauschen (SCEs) führen können. (frei nach Vasileva + Jessberger 2005)

2.3.2 Die Homologe Rekombination

Neben der Reparatur von heterochromatischen DSBs in der G2-Phase ist die HR vor allem bei der Reparatur Replikations-assoziiierter DNA-Schäden während der S-Phase von großer Bedeutung. Die Reparaturprozesse an arretierten oder kollabierten Replikationsgabeln werden in Kapitel 2.4 intensiv erörtert. Hier sollen nun zunächst die allgemeinen Prinzipien des HR-Vorgangs anhand der Reparatur eines zwei-endigen DSBs erklärt werden. Der grundlegende Ablauf der HR ist in Abb.2.5 skizziert und kann in drei Abschnitte unterteilt werden: die Praesynapsis, die Synapsis und die Postsynapsis (Heyer et al. 2010).

Der initiale Schritt der HR während der Praesynapsis ist eine Resektion der beiden Enden eines DSBs in 5'-3'-Richtung, durch die ein einzelsträngiges 3'-Ende entsteht, an das RPA angelagert wird. Katalysiert durch BRCA2 wird RPA durch Rad51 verdrängt und das sogenannte Rad51-Nukleoproteinfilament bildet sich aus. Während der Synapsis erfolgt die Stranginvasion, bei der eines der mit Rad51 beladenen 3'-Enden in den homologen Bereich der Schwesterchromatide einwandert und mit dem komplementären DNA-Strang paart. Eine solche Paarung zweier DNA-Stränge von unterschiedlichen Schwesterchromatiden wird als Heteroduplex-DNA bezeichnet. Durch die Stranginvasion wird der zweite DNA-Strang der Schwesterchromatide verdrängt und es bildet sich eine Struktur aus, die als *displacement loop* (kurz: D-Loop) bezeichnet wird.

In den nachfolgenden Stadien der Postsynapsis können nun unterschiedliche HR-Unterwege ablaufen: der Prozess des *synthesis dependent strand annealing* (SDSA, siehe Abschnitt 2.3.2.2) oder der in Abb.2.5 dargestellte Weg der HR über die Ausbildung einer doppelten Holliday-Struktur (im Folgenden als dHJ-HR bezeichnet). Dabei paart nun der verdrängte DNA-Strang der Schwesterchromatide mit dem zweiten Rad51-beladenen 3'-Ende. Dieser Prozess wird als *second end capture* bezeichnet. Somit können nun beide eingewanderten DNA-Enden anhand der Vorlage der homologen DNA-Stränge durch Polymerasen verlängert werden, bis die fehlenden Bereiche um den DSB wieder aufgefüllt sind. Die verbleibenden SSBs zwischen den neusynthetisierten und den ursprünglichen DNA-Bereichen werden mit Hilfe der Ligase I geschlossen und es kommt zur Ausbildung einer sogenannten doppelten Holliday-Struktur (*double Holliday junction*), einer Struktur mit zwei Kreuzungspunkten zwischen DNA-Strängen der beiden Schwesterchromatiden.

Im letzten Schritt der HR wird diese Struktur aufgelöst und die normale Struktur der beiden Schwesterchromatiden wird wiederhergestellt. Für diese Auflösung der doppelten Holliday-Struktur stehen der Zelle mehrere Wege zur Verfügung. Diese können teilweise mit einem reziproken Austausch von DNA-Bereichen zwischen den Schwesterchromatiden assoziiert sein, die als Schwesterchromatidaustausch-Ereignisse (*sister chromatid exchanges*, SCE) sichtbar werden. Die einzelnen Schritte des HR-Prozesses werden nun im Folgenden detailliert beschrieben.

2.3.2.1 Resektion der Bruchenden und Anlagerung von Rad51

Die Resektion der Bruchenden stellt den initialen Schritt der HR dar. Dabei werden die beiden 5'-Enden des DSBs abgebaut um einen längeren Bereich ssDNA am 3'-Ende zu schaffen, an welchen sich das Replikationsprotein A (RPA) anlagert, um eine Ausbildung von Sekundärstrukturen in der ssDNA zu verhindern. Dieser Resektionsprozess ist sehr komplex und es wurde eine Reihe verschiedener Proteine identifiziert, die daran beteiligt sind. Die genauen Vorgänge sind aber noch nicht vollständig aufgeklärt und weiterhin Gegenstand intensiver Untersuchungen. Man geht davon aus, dass die Nukleasen Mre11 und CtIP die initialen Schritte der Resektion übernehmen (Sartori et al. 2007, Mimitou + Symington 2009). Dabei wurde ein Modell postuliert, nach dem Mre11 und CtIP die Resektion durch einen endonukleolytischen Prozess einleiten, bei dem etwa 50 – 100 Nukleotide des 5'-Stranges entfernt werden (Mimitou + Symington 2008, Zhu et al. 2008). Für die weitere Resektion der Bruchenden werden nun weitere Faktoren benötigt. Daran scheinen die Nuklease Exo1 (Langerak et al. 2011) und die Helikase Bloom (BLM) beteiligt zu sein. Exo1 besitzt eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität und scheint teilweise redundant zu Mre11 zu wirken (Tran et al. 2004, Krogh + Symington 2004). BLM kann durch seine Helikase-Aktivität die DNA entwinden und so einen ssDNA-Bereich erzeugen (Ellis et al. 1995, Wu + Hickson 2003). Da BLM aber keine Nuklease-Aktivität besitzt, wird ein zweiter Faktor benötigt um den entwundenen 5'-Strang zu entfernen. Diese Funktion wird der Nuklease Dna2 zugeschrieben (Zhu et al. 2008), aber auch Exo1 wird in diesem Zusammenhang diskutiert (Nimonkar et al. 2008, Mimitou + Symington 2009).

Eine Kernkomponente der HR ist das Protein Rad51, welches zur Rad52-Epistasgruppe gehört, zu der noch weitere Rad-Proteine (z. B. Rad50, Rad52, Rad54) zählen (Symington 2002). Rad51 lagert sich an die bei der Resektion entstandene 3'-ssDNA unter Verdrängung von RPA an und bildet mit dieser die charakteristische Struktur des Rad51-Nukleoproteinfilaments aus. Dieser Vorgang wird durch unterschiedliche Faktoren wie den Rad51-Paralogen unterstützt. Zur Gruppe der Rad51-Paraloge zählen in Säugern fünf Proteine (z. B. XRCC3 und Rad51D), die strukturelle Ähnlichkeiten zu Rad51 aufweisen (Heyer et al. 2010). Wie genau diese Proteine die Ausbildung des Rad51-Nukleoproteinfilaments fördern, ist noch unklar. Für jedes einzelne Rad51-Paralog wurde aber gezeigt, dass eine Defizienz zu einer Beeinträchtigung der HR und einem Defekt in der Ausbildung von Rad51-Foci führt (Takata et al. 2001). Darüber hinaus sind Mäuse mit Nullmutationen dieser Gene nicht lebensfähig (Schild et al. 2000, Thacker 2005).

Eine essentielle Funktion bei der Ausbildung des Rad51-Nukleoproteinfilaments kommt dem Brustkrebs-assoziierten Protein BRCA2 zu. Die beiden Proteine BRCA1 und BRCA2 stehen in Zusammenhang mit der Entwicklung bestimmter Krebsarten. So wurde in etwa 50 % aller Fälle von erblich bedingtem Brustkrebs eine Keimbahnmutation im *BRCA1*-Gen und bei 25 % im *BRCA2*-Gen nachgewiesen (Ting + Lee 2004, Shivji + Venkitaraman 2004). Da-

rüber hinaus steht ein *BRCA2*-Gendefekt auch im Zusammenhang mit der Ausbildung von Ovarial- und Pankreastumoren (Gudmundsdottir + Ashworth 2006). Das humane *BRCA2*-Protein besitzt eine ssDNA- und eine dsDNA-Bindedomäne sowie acht konservierte Rad51-Interaktionsmotive, die als *BRC repeats* bezeichnet werden (Yang et al. 2005, Moynahan + Jasin 2010). Diese *BRC*-Motive sind essentiell für den Ablauf der HR und Deletionen im *BRCA2*-Gen, die diese Sequenzen beinhalten, sind in Mäusen embryonal letal (Moynahan 2002). In einer ungeschädigten Zelle liegt *BRCA2* über die *BRC*-Motive an Rad51 gebunden vor und hält dieses in einem inaktiven Zustand (Marmorstein et al. 1998, Yu et al. 2003). Nach der Induktion von DSBs wird zum einen Rad51 durch die Kinase Chk1 aktiviert (Sorensen et al. 2005). Zum anderen kommt es zu einer Monoubiquitinierung des Proteins FANCD2, welches nun mit *BRCA2* interagieren und mit dem Chromatin assoziieren kann. FANCD2 wird daher die Aufgabe der Rekrutierung des aktivierten *BRCA2*/Rad51-Komplexes zu den resektierten Bruchenden zugeschrieben (Wang + D'Andrea 2004). Dort kann *BRCA2* die angelagerten RPA-Moleküle kompetitiv verdrängen und so die Anlagerung von Rad51 an die ssDNA fördern (Jensen et al. 2010, Thorslund et al. 2011). Aktuelle Studien haben eine zusätzliche, stabilisierende Funktion von *BRCA2* für das Rad51-Nukleoproteinfilament beschrieben, die über eine weitere konservierte Rad51-Bindedomäne von *BRCA2* vermittelt wird. Über diese C-terminale Domäne, die weder für die Beladung der ssDNA mit Rad51 essentiell ist noch für die generelle Fähigkeit HR durchzuführen, scheint *BRCA2* an das Rad51-Nukleoproteinfilament zu binden und es dadurch zu stabilisieren (Schlacher et al. 2011).

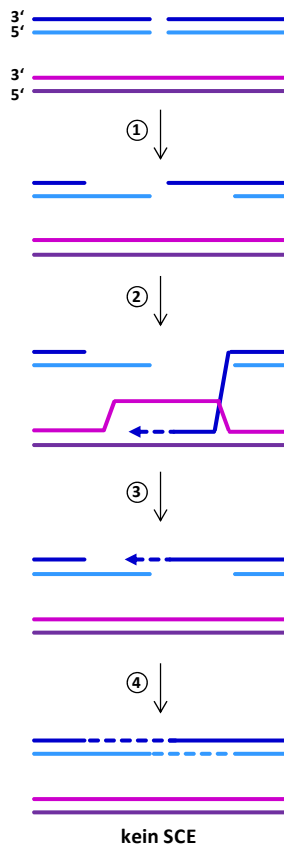
Die Homologiesuche und die Stranginvasion des Rad51-Nukleoproteinfilaments in den homologen Bereich der Schwesterchromatide werden von der Helikase Rad54 unterstützt. Dieses Protein der Rad52-Epistasisgruppe hat eine stabilisierende Wirkung auf das Rad51-Nukleoproteinfilament und fördert die Ausbildung des D-Loops. Daneben begünstigt Rad54 aber auch die Ablösung von Rad51 von der Heteroduplex-DNA und unterstützt somit den Beginn der DNA-Synthese (Heyer et al. 2010).

2.3.2.2 Unterwege der HR: synthesis dependent strand annealing und HR über eine doppelte Holliday-Struktur

Der HR-Prozess ist assoziiert mit Gen-Konversionen. Dieser Begriff beschreibt einen nicht-reziproken Austausch genetischer Information von einem DNA-Molekül auf sein Homolog. Das bedeutet, dass die Information einer DNA-Sequenz auf ein anderes DNA-Molekül (bei der HR: die zweite Schwesterchromatide) kopiert wird. Durch diesen Prozess geht die Information der DNA zwar nicht verloren, er führt aber zu einem Verlust der Heterozygotie in dem betroffenen Bereich. Dieses Ereignis ist nicht zu verwechseln mit Rekombinationsprozessen, bei denen ein reziproker Austausch stattfindet. Hier bleibt die Heterozygotie erhalten.

Das grundlegende Modell der HR über eine doppelte Holliday-Struktur geht zurück auf Szostak et al. und entspricht den Modellen, die in Abb.2.5 und Abb.2.6 dargestellt sind (Szostak et al. 1983). Dabei paaren beide resektierten Enden eines DSBs mit dem homologen Bereich der Schwesterchromatide. Dies erfolgt zum einen durch die Stranginvasion

Synthesis dependent strand annealing



HR via double Holliday junction

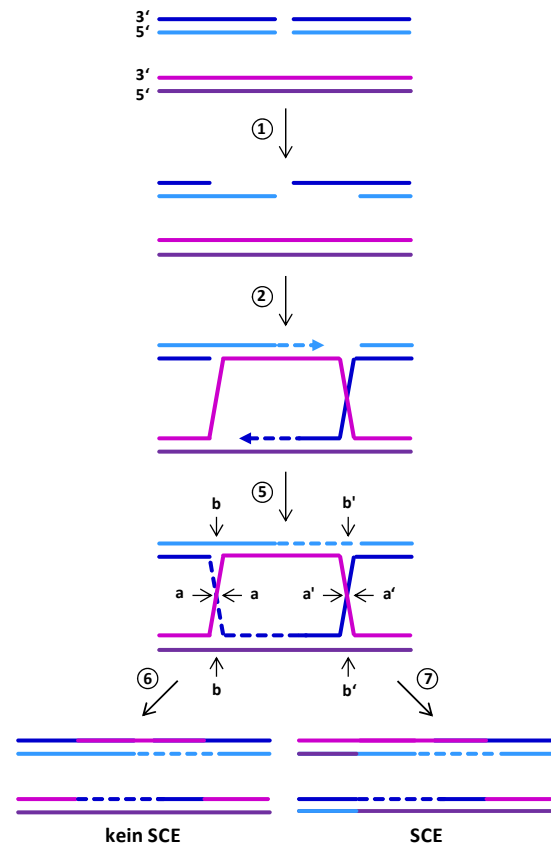


Abb.2.6: Unterwege der HR an zwei-endigen DSBs: *synthesis dependent strand annealing* (SDSA) und HR via *double Holliday junction* (dHJ-HR)

Initial laufen bei SDSA und dHJ-HR die gleichen Schritte ab. Die Bruchenden werden durch Resektasen in 5'-3'-Richtung resektiert (1), Rad51 lagert sich BRCA2-vermittelt an die entstandenen ssDNA-Enden an und das Rad51-Nukleoproteinfilament vollzieht die Stranginvasion in den homologen Bereich der Schwesterchromatide (2). Im Gegensatz zur dHJ-HR erfolgt beim „*bubble migration*“-Modell der SDSA nur eine begrenzte DNA-Synthese am eingewanderten Strang. Danach wird der D-Loop wieder aufgelöst und der nur um ein relativ kurzes Stück verlängerte DNA-Strang paart mit dem zweiten resektierten Bruchende (3). Das Auffüllen der noch fehlenden DNA-Bereiche erfolgt nun alleine innerhalb der geschädigten Schwesterchromatide (4).

Der Weg der dHJ-HR beschreibt den Prozess, der auch in Abb.2.5 dargestellt ist. Der Unterschied zum SDSA liegt darin, dass die fehlenden DNA-Sequenzen im geschädigten Bereich komplett anhand der Informationen der Schwesterchromatide aufgefüllt werden. Zudem kommt es hier zur Ausbildung einer doppelten Holliday-Struktur (5), deren Auflösung zum reziproken Austausch von DNA-Bereichen zwischen den beiden Schwesterchromatiden führen kann. An den beiden Kreuzungspunkten der doppelten Holliday-Struktur können Resolvasen (z. B. Mus81) sowohl die gekreuzten als auch die ungekreuzten DNA-Stränge schneiden. Erfolgt dies an beiden Kreuzungspunkten gleich (an **a** und **a'** (6) oder an **b** und **b'**), wird kein SCE ausgebildet. Werden diese Strukturen aber unterschiedlich aufgelöst (an **b** und **a'** (7) oder an **a** und **b'**), entsteht ein SCE.

eines ssDNA-Endes in den homologen Bereich und zum anderen durch eine Paarung des zweiten ssDNA-Endes mit dem verdrängten DNA-Strang der Schwesterchromatide (Abb.2.6). Dadurch bilden sich zwei Bereiche einer Heteroduplex-DNA aus. Das Charakteristikum der dHJ-HR ist die Ausbildung der doppelten Holliday-Struktur, also zweier Kreuzungspunkte zwischen den DNA-Strängen der beiden Chromatiden, die über unterschiedliche Wege aufgelöst werden können (siehe Abschnitt 2.3.2.3). Diese sind zum Teil mit einem reziproken Austausch von homologen Bereichen zwischen den beiden Schwesterchromatiden (SCEs) assoziiert (Orr-Weaver + Szostak 1983).

Obwohl doppelte Holliday-Strukturen seit mehr als 25 Jahren als ein Intermediat des HR-Prozesses postuliert werden, konnten diese Strukturen für lange Zeit ausschließlich während meiotischen Rekombinations-Prozessen nachgewiesen werden (Schwacha + Kleckner 1995). Erst vor kurzem ist es in Hefe-Studien gelungen, die doppelte Holliday-Struktur auch im Zusammenhang mit DSB-Reparaturprozessen nachzuweisen (Bzymek et al. 2010). Bezogen auf die Menge an induzierten DSBs scheint die doppelte Holliday-Struktur aber ein eher seltenes Ereignis zu sein (Ira et al. 2003). Dies unterstützt Annahmen, dass der Prozess der SDSA den dominierenden HR-Weg bei der Reparatur zwei-endiger DSBs darstellt (Heyer et al. 2010).

Im Gegensatz zur dHJ-HR führt das *synthesis dependent strand annealing* (SDSA) in der Regel nicht zur Ausbildung von SCEs. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei diesem Mechanismus keine doppelte Holliday-Struktur auftritt, die über Resolvasen aufgelöst wird. Die initialen Schritte laufen beim SDSA gleich ab wie bei der dHJ-HR. Die Bruchenden werden resektiert und ein 3'-ssDNA-Ende vollzieht die Stranginvasion in den homologen Bereich der Schwesterchromatide. Das am weitesten verbreitete SDSA-Modell ist das sogenannte „*bubble migration*“-Modell und basiert auf der Annahme, dass hier nur ein Bruchende eine Paarung mit dem homologen Bereich der Schwesterchromatide eingeht (Abb.2.6). Der D-Loop bleibt dabei sehr klein und der neusynthetisierte Strang wird kontinuierlich aus der Heteroduplex-DNA gelöst, so dass es nicht zum Prozess des *second end capture* kommt (Formosa + Alberts 1986). Stattdessen paart der neusynthetisierte Strang wieder mit dem zweiten resektierten Bruchende. Das Auffüllen der fehlenden DNA-Bereiche durch Polymerasen erfolgt dann innerhalb dieser Struktur der gepaarten DSB-Enden und ist unabhängig von der Schwesterchromatide. Die DNA-Synthese erfolgt somit konservativ, d. h. alle während des HR-Vorgangs neusynthetisierten DNA-Sequenzen befinden sich auf einer Schwesterchromatide (Paques + Haber 1999).

Neben dem „*bubble migration*“-Modell gibt es auch SDSA-Modelle, die den Vorgang des *second end capture* beinhalten. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich das zweite Bruchende an den bei der Stranginvasion verdrängten DNA-Strang anlagert. Wie beim Weg der dHJ-HR werden somit beide resektierten 3'-Enden anhand der Vorlage der homologen DNA-Stränge verlängert. Jedoch werden beide Stränge wieder aus der Heteroduplex-DNA abgelöst, bevor es zur Ausbildung der doppelten Holliday-Struktur kommt, so dass der

Reparaturvorgang wie beim „*bubble migration*“-Modell konservativ erfolgt. Dieser Prozess könnte durch Topoisomerasen oder Helikasen unterstützt werden (Thaler et al. 1987, McGill et al. 1989).

Ein weiterer Unterweg der HR ist der Mechanismus der *break-induced replication* (BIR). Dieser Prozess dient zur Reparatur ein-endiger DSBs, also unter Bedingungen, bei denen ein zweites Bruchende fehlt. Dabei vollzieht das vorhandene Bruchende eine Stranginvasion, wobei ein D-Loop ausgebildet wird, der in eine aktive Replikationsgabel umgewandelt werden kann. Daher ist die BIR vor allem bei der Reparatur arretierter und kollabierter Replikationsgabeln von Bedeutung. Dieser Vorgang wird in Kapitel 2.4.3 genauer beschrieben.

2.3.2.3 Auflösung der doppelten Holliday-Struktur

Erfolgt ein HR-Prozess über die Ausbildung einer doppelten Holliday-Struktur, besteht der letzte Schritt des Reparaturvorganges in der Auflösung dieser Struktur. Hierzu stehen der Zelle unterschiedliche Wege zur Verfügung, die nur zum Teil mit der Ausbildung von SCEs assoziiert sind.

Der in Säugern vorherrschende Mechanismus wird als *dissolution* bezeichnet und ist abhängig vom sogenannten BTR-Komplex, bestehend aus der Helikase BLM, der Topoisomerase III α und den assoziierten Faktoren RMI1 und RMI2 (Wu + Hickson 2003, Hoadley et al. 2010). Über eine „*branch migration*“-Aktivität ist BLM in der Lage die beiden Kreuzungspunkte der doppelten Holliday-Struktur zueinander zu verschieben, bis sie schließlich ineinander verschmelzen (Karow et al. 2000, van Brabant et al. 2000). Dabei wird eine hemikatenane Struktur ausgebildet, in der zwei DNA-Stränge (je ein Strang aus beiden Chromatiden) in Form von zwei Schleifen ineinander hängen. Diese Struktur kann dann von der Topoisomerase III α aufgelöst werden, wobei es nie zum Austausch von DNA-Bereichen zwischen den beiden Chromatiden kommt. Der BLM-abhängige Weg ist daher nicht mit der Ausbildung von SCEs verbunden (Wu + Hickson 2003). Das menschliche Krankheitsbild, das durch einen *BLM*-Gendefekt hervorgerufen wird, ist das Bloom-Syndrom, welches unter anderem durch eine chromosomale Instabilität und durch eine erhöhte Prädisposition für verschiedene Krebsarten gekennzeichnet ist (Bachrati + Hickson 2003). Darüber hinaus zeigen *BLM*-defiziente Zellen eine deutliche Zunahme spontaner SCEs (Chaganti et al. 1974, German et al. 1977). Dies weist darauf hin, dass der BLM-abhängige Prozess der *dissolution* den Hauptweg zur Auflösung doppelter Holliday-Strukturen darstellt. Im Falle einer *BLM*-Defizienz überwiegen dann die SCE-assozierten Auflösungsprozesse.

Zur Ausbildung von SCEs kann es bei den Auflösungsprozessen der doppelten Holliday-Struktur kommen, die als *resolution* bezeichnet werden. Dabei werden die DNA-Stränge an den Kreuzungspunkten geschnitten, was sowohl an den gekreuzten als auch an den ungekreuzten DNA-Strängen erfolgen kann. Werden die DNA-Stränge an beiden Kreuzungs-

punkten unterschiedlich geschnitten, führt dies zur Ausbildung eines SCEs (Paques + Haber, 1999). Diese Auflösungsvorgänge können von zwei unterschiedlichen Endonukleasen durchgeführt werden: entweder durch Gen1 (Ip et al. 2008, Rass et al. 2010) oder durch Mus81, das in Säugern in einem heterodimeren Komplex mit der nicht-katalytischen Komponente Eme1 vorliegt (Constantinou et al. 2002, Taylor + McGowan 2008). Die enzymatischen Prozesse beider Resolvasen sind vergleichbar, die Proteine unterscheiden sich aber etwas in ihrer Substrat-Spezifität. Mus81 zeigt beispielsweise die größte Affinität zu verzweigten DNA-Strukturen wie Replikationsgabeln oder 3'-Überhängen, wird aber auch durch doppelte Holliday-Strukturen, die einen SSB aufweisen, aktiviert (Boddy et al. 2001, Chen et al. 2001). Gen1 schneidet dagegen bevorzugt intakte Holliday-Strukturen (Schwartz + Heyer 2011).

2.4 DNA-Reparaturprozesse in der S-Phase

2.4.1 Induktion Replikations-assoziiierter DNA-Schäden

Die Hauptquelle endogener DNA-Schäden ist die Replikation. Zwar hat sich die Replikation evolutionär zu einem hochspezialisierten und nahezu fehlerfreien Prozess zur Verdopplung der DNA entwickelt, dennoch kann die Replikationsgabel durch eine Vielzahl an Läsionen in der DNA arretiert werden (Abb.2.7). Je nach der Ursache des Replikations-Arrests stehen der Zelle unterschiedliche Wege zur Verfügung, diese Blockade zu überwinden (Osman + Whitby 2007). Daher stellt eine arretierte Replikationsgabel oft nur einen temporären Zustand dar, bis die Replikation wieder aufgenommen werden kann (Petermann et al. 2010). Wird ein Replikations-Arrest jedoch über mehrere Stunden aufrechterhalten, kann die Replikationsgabel kollabieren. Dieser Prozess beschreibt die Dissoziation der Replikations-Maschinerie von der Replikationsgabel, welche dadurch inaktiviert wird. Eine direkte Wiederaufnahme der Replikation ist dann nicht mehr möglich (Petermann et al. 2010). Solche inaktivierten Replikationsgabeln werden daraufhin durch den Endonuklease-Komplex Mus81-Eme1 geschnitten, was zur Ausbildung eines ein-endigen DSBs führt (Abb.2.7) (Hanada et al. 2007). Dieser kann abschließend über unterschiedliche HR-Prozesse repariert werden (siehe Kapitel 2.4.3).

Sehr häufig auftretende Läsionen in der DNA sind Basenmodifikationen wie oxidierte, methylierte und desaminierte Basen. Trifft eine Replikationsgabel auf einen solchen Basenschaden, kann die Strangsynthese blockiert werden, da die Polymerasen kein passendes Nukleotid in den neusynthetisierten Strang einbauen können (Larson et al. 1985). Ein unüberwindbares Hindernis für die Replikationsgabel stellen *Interstrand-Crosslinks* dar, wie sie zum Beispiel durch Mitomycin C oder Cis-Platin erzeugt werden. Aufgrund der kovalen-

ten Bindung zwischen zwei Basen auf den gegenüberliegenden DNA-Strängen, kann die Helikase der Replikations-Maschinerie den DNA-Doppelstrang nicht entwinden. Dadurch kommt die Replikation an dieser Stelle zum Erliegen. Die Reparatur solcher Schäden ist sehr komplex und benötigt eine Vielzahl unterschiedlicher Reparaturfaktoren (Deans + West 2011). Darüber hinaus können auch Sekundärstrukturen der DNA oder an die DNA angelagerte Proteine das Fortschreiten einer Replikationsgabel hemmen (Usdin + Woodford 1995).

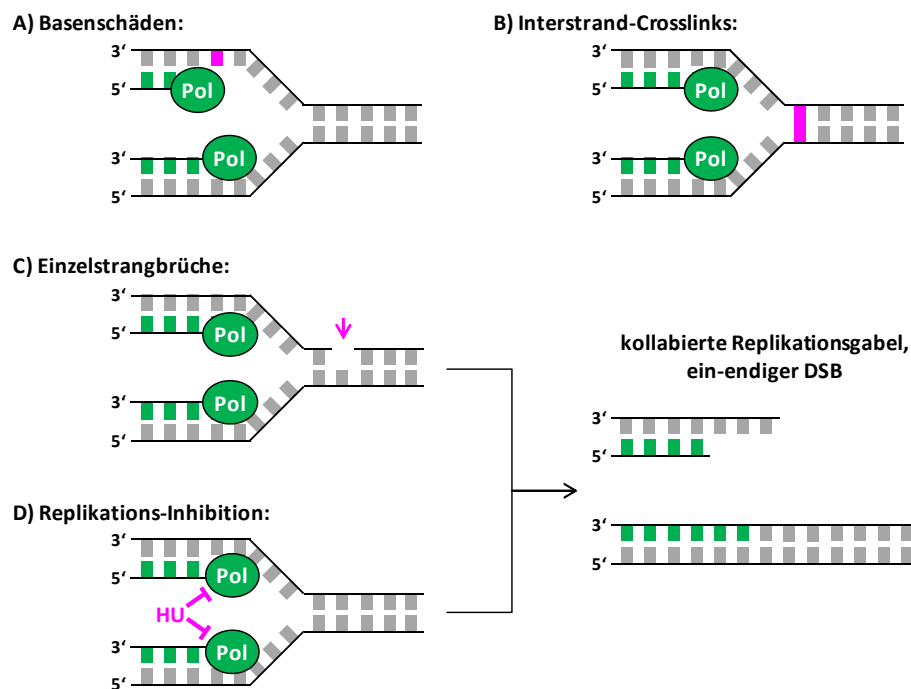


Abb.2.7: Unterschiedliche Ursachen Replikations-abhängiger DNA-Schäden

Die Replikationsgabel ist eine empfindliche Struktur und ein großes Spektrum an DNA-Schäden kann das Fortschreiten der Replikation stören. Unterschiedliche Basenmodifikationen (z. B. methylierte Basen nach einer Behandlung mit MMS) können die DNA-Synthese der DNA-Polymerasen zumindest transient blocken (**A**). *Interstrand-Crosslinks* sind unüberwindbare Hindernisse für die Replikation, da die beiden DNA-Stränge hier nicht durch Helikasen voneinander getrennt werden können (**B**). Einzelstrangbrüche (z. B. induziert durch CPT oder H_2O_2) oder abasische Stellen können die Replikation blocken und zur Ausbildung ein-endiger DSBs führen (**C**). Verschiedene chemische Agenzien wie Hydroxyharnstoff (HU) oder Aphidicolin inhibieren die Elongation der Replikation. Dadurch werden die aktiven Replikationsgabeln arretiert. Wird dieser Replikations-Arrest über längere Zeit aufrechterhalten, kollabieren die Replikationsgabeln, was mit der Ausbildung ein-endiger DSBs einhergeht (**D**).

Durch eine Reihe chemischer Verbindungen können die DNA-Polymerasen direkt oder indirekt inhibiert werden, was eine fortschreitende DNA-Synthese an der Replikationsgabel verhindert. So ist Aphidicolin beispielsweise ein direkter Hemmstoff der replikativen DNA-Polymerasen α und ϵ (Hanada et al. 2007). Eine indirekte Hemmung der DNA-Synthese erfolgt dagegen durch Hydroxyharnstoff (HU), das die aktive Stelle der Ribonukleotid-

Reduktase inhibiert. Dieses Enzym reduziert Ribonukleosid-Triphosphate zu Desoxyribonukleosid-Triphosphaten und ist somit essentieller Bestandteil des Synthesewegs für dNTPs, den Bausteinen der DNA. Durch eine Behandlung mit HU verarmt die Zelle an Nukleotiden und die DNA-Synthese durch die Polymerasen kommt zum Erliegen. Die Replikationsgabeln werden dadurch arretiert (Bianchi et al. 1986, Lundin et al. 2002). Eine Besonderheit der Wirkung von HU besteht darin, dass die Dauer der HU-Behandlung die Art der erzeugten Schäden beeinflusst. So führen kurze Behandlungszeiten lediglich zu arretierten Replikationsgabeln, die nach Entfernen der Chemikalie die Replikation zum großen Teil wiederaufnehmen können (Petermann et al. 2010). Mit zunehmender Behandlungsdauer (ab 6 h) beginnen die betroffenen Replikationsgabeln zu kollabieren und eine zunehmende Menge an DSBs kann detektiert werden (Saintigny et al. 2001, Hanada et al. 2007).

Ein weiterer DNA-Schaden, der ein Fortschreiten der Replikation stören kann, ist der SSB. Diese Läsion stellt einen Teil des Spektrums an DNA-Schäden nach ionisierender Strahlung dar. Es gibt aber auch Agenzien, die gezielt SSBs induzieren. Camptotecin (CPT) ist ein Inhibitor der DNA-Topoisomerase I (Topo I), einem Enzym, das in der DNA auftretende Spannungen reguliert. Die dabei ablaufenden Prozesse beinhalten eine gezielte Ausbildung von SSBs, die von Topo I abschließend wieder geschlossen werden (Pommier et al. 1998). CPT kann sich nun an eine Zwischenstufe dieses Prozesses anlagern, in der Topo I kovalent an die DNA gebunden ist, und verhindert dadurch den Ligationsschritt. Die SSBs verbleiben somit in der DNA und können an Replikationsgabeln in DSBs umgewandelt werden (Strumberg et al. 2000, Pommier 2004). Eine solche Ausbildung eines DSBs scheint dabei nur dann aufzutreten, wenn durch den CPT-induzierten SSB die Synthese des Leitstrangs gestört wird. Hier kommt es zu einem Prozess, der als *replication fork run-off* bezeichnet wird. Dieser Ausdruck beschreibt eine Dissoziation der DNA-Polymerasen von der DNA, wenn sie auf einen SSB treffen. Dadurch fällt ein Arm der Replikationsgabel ab und bildet einen ein-endigen DSB aus (Abb.2.7). Dieser Prozess scheint nicht aufzutreten, wenn die Synthese des Folgestrangs betroffen ist (Strumberg et al. 2000).

2.4.2 Mechanismen der Reparatur arretierter Replikationsgabeln

Einer Zelle stehen unterschiedliche Möglichkeiten zur Überwindung eines Replikations-Arrests zur Verfügung. Dabei ist die Art der Läsion, die zu diesem Arrest geführt hat, dafür entscheidend, welcher Reparaturweg eingeschlagen werden kann.

So können viele Basen-Modifikationen durch den Weg der *translesion synthesis* (TLS) überwunden werden. Die blockierende Wirkung von Basenschäden beruht auf der hochspezifischen Arbeitsweise der replikativen DNA-Polymerasen (Pol δ und Pol ϵ), die aufgrund ihrer Korrekturlese-Aktivität an modifizierten Basen keine passenden Nukleotide in den neusynthetisierten Strang einbauen können. Beim Vorgang der TLS werden diese hoch-

spezifischen Polymerasen durch TLS-Polymerasen ersetzt, die deutlich weniger spezifisch agieren. Die TLS-Polymerasen (z. B. Pol η , Pol ι und Pol κ) zählen zur γ -Familie der DNA-Polymerasen und unterscheiden sich untereinander in ihrer Substratspezifität (Ohmori et al. 2009). Durch den Einbau eines nicht spezifisch passenden Nukleotids können die TLS-Polymerasen die geschädigte Stelle überwinden. Für die weitere Replikation werden sie dann wieder durch die replikativen Polymerasen ersetzt (Polsky + Woodgate 2004, Prakash et al. 2005). Obwohl die TLS somit nicht fehlerfrei agiert und das Risiko einer Punktmutation birgt, scheint sie dennoch einen der dominierenden Wege zur Überwindung solcher Replikationsblockaden durch Basenschäden darzustellen (Heyer et al. 2010).

Eine grundlegende Strategie der Zelle bei einem Replikations-Arrest besteht in einer Stabilisierung der Replikationsgabel und des angelagerten Replisoms, bis der für den Arrest ursächliche Schaden behoben ist und die Replikation wiederaufgenommen werden kann (Osman + Whitby 2007). Diese Stabilisierung ist hauptsächlich bei kurzen Replikations-Blockaden von Bedeutung und vor allem Faktoren der Zellzykluskontrolle (z. B. ATR, Chk1) und der Kohäsion der Schwesterchromatiden (z. B. Claspin) scheinen daran beteiligt zu sein (Zachos et al. 2005, Scorch + McGowan 2009). Die genauen Prozesse, wie die Zellzykluskontrolle zur Stabilität der Replikationsgabel beiträgt, sind aber noch unklar.

Eine weitere Methode eine arretierte Replikationsgabel zu stabilisieren ist der Prozess der *fork regression* (Abb.2.8.A, Schritt 3). Dabei bewegt sich die Replikationsgabel ein Stück zurück. Erreicht wird dies, indem sich die parentalen DNA-Stränge wieder von den neusynthetisierten Strängen ablösen und sich erneut aneinanderlagern. Die freiwerdenden neusynthetisierten Stränge paaren ebenfalls, so dass eine charakteristische Form der Holliday-Struktur entsteht, die als „*chicken foot*“-Struktur bezeichnet wird (Heyer et al. 2010). Bis jetzt wurde diese Struktur nur in Hefe-Zellen experimentell nachgewiesen (Sogo et al. 2002), viele Modelle gehen aber davon aus, dass der Prozess der *fork regression* auch in Säugern von Bedeutung ist (Petermann + Helleday 2010). Der genaue Mechanismus dieses Prozesses ist noch unklar, mehrere Studien erbrachten aber Hinweise darauf, dass die Helikasen BLM und WRN (Werner-Helikase) daran beteiligt sein können. Für beide Proteine konnte *in vitro* eine „*Holliday junction migration*“-Aktivität nachgewiesen werden. Dies beschreibt die Fähigkeit, den Kreuzungspunkt einer Holliday-Struktur entlang der DNA zu verschieben (Machwe et al. 2006, Ralf et al. 2006).

Die „*chicken foot*“-Struktur stellt eine stabile Struktur dar, in der die Zelle den Zeitraum überbrücken kann, bis die blockierende Läsion von der DNA entfernt wurde. Danach kann die Replikation wiederaufgenommen werden (Abb.2.8.A, Schritt 4). Darüber hinaus stellt diese Struktur aber auch den Ausgangspunkt für einen Reparaturprozess dar, der als *lesion bypass* durch *template switching* bezeichnet wird (Higgins et al. 1976). Dieser Reparaturweg wird möglich, wenn an der Replikationsgabel die Synthese des Leitstrangs blockiert wird (z. B. durch einen Basenschaden), die Synthese des Folgestrangs aber noch ein Stück weiter erfolgt (Osman + Whitby 2007). Nach der *fork regression* entsteht hier eine „*chicken*

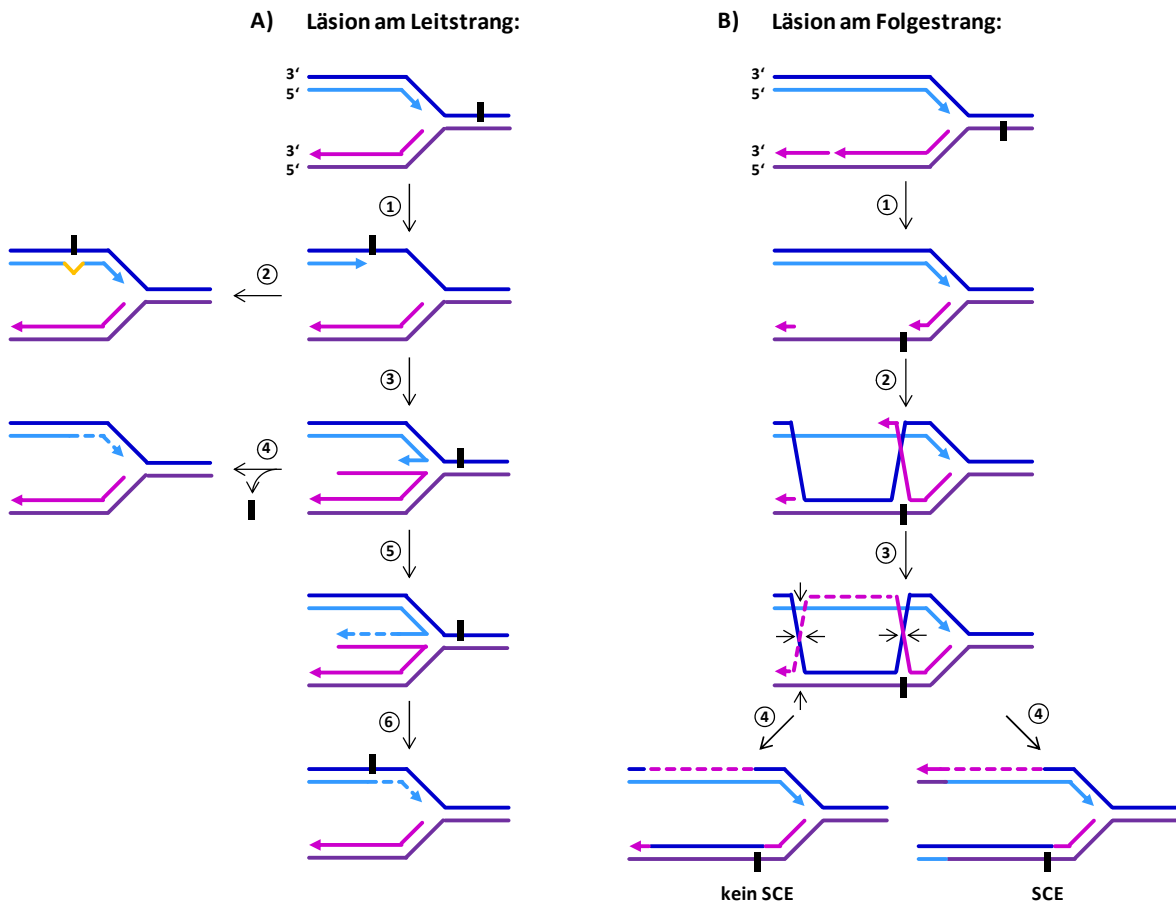


Abb.2.8: Reparaturwege zur Überwindung einer Replikations-Blockade

Dargestellt ist die Situation einer Replikations-Blockade durch einen Basenschaden. Wird die Synthese des Leitstrangs (blau) durch diese Läsion (schwarz) gestört (**A**) bildet sich ein längerer Bereich ssDNA an der Replikationsgabel aus (**1**). Eine Möglichkeit den Schaden zu überwinden bietet der Weg der *translesion synthesis* (TLS). Dabei wird die Synthese über die Läsion von TLS-Polymerasen übernommen, die weniger spezifisch agieren als die replikativen DNA-Polymerasen (**2**). Eine in Hefen nachgewiesene und in Säugern postulierte Methode der Stabilisierung einer blockierten Replikationsgabel besteht in der Ausbildung einer „chicken foot“-Struktur durch den Prozess der *fork regression*. Dabei wandert die Replikationsgabel ein Stück zurück, so dass sowohl die bereits getrennten, parentalen DNA-Stränge als auch die neusynthetisierten DNA-Bereiche paaren (**3**). Wenn der ursprüngliche DNA-Schaden repariert wurde, kann die Replikation aus dieser Struktur heraus wieder aufgenommen werden. Dies kann über eine Umkehrung der *fork regression* erfolgen (**4**). Erfolgt die ursprüngliche DNA-Synthese am Folgestrang (bei (**1**)) noch über den Bereich der Läsion hinaus, eröffnet dies den Weg des *lesion bypass*. Dabei wird der kürzere Leitstrang innerhalb der „chicken foot“-Struktur anhand der Vorlage des Folgestrangs verlängert (**5**). Durch eine Umkehrung der *fork regression* kann danach wieder eine aktive Replikationsgabel ausgebildet werden, in der die ursprüngliche Läsion überwunden ist (**6**).

Bei einer Läsion auf dem Folgestrang (violett) (**B**) wird die Synthese eines Okazaki-Fragments blockiert. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer ssDNA-Lücke auf dem Folgestrang hinter der Replikationsgabel (**1**). Eine einfache Möglichkeit zur Überwindung der blockierenden Läsion ist die TLS (nicht dargestellt). Daneben kann das freie 3'-Ende am Folgestrang aber auch eine Stranginvasion in den homologen Bereich der Schwesterchromatide vollziehen (**2**). Der bei der Stranginvasion verdrängte parentale Leitstrang kann dabei mit dem ssDNA-Bereich auf dem parentalen Folgestrang paaren, was zur Ausbildung einer einfachen Holliday-Struktur führt. Nach der DNA-Synthese am eingewanderten Folgestrang kann es zur Ausbildung einer doppelten Holliday-Struktur kommen (**3**), deren Auflösung in einem SCE resultieren kann (**4**). Nach der Stranginvasion des 3'-Endes wären alternativ auch SDSA-ähnliche Prozesse ohne doppelte Holliday-Struktur denkbar.

foot“-Struktur, bei der das freie DSB-Ende einen Überhang des Folgestrangs besitzt (Abb.2.8). Dieser kann nun als Vorlage für eine DNA-Synthese am angelagerten Leitstrang dienen. Der Leitstrang wird so über die Stelle hinaus verlängert, an der die DNA-Synthese durch die DNA-Läsion blockiert wurde. Nach einer Re-Initiierung der Replikationsgabel ist der DNA-Schaden somit überwunden und die Replikation kann fortgesetzt werden, selbst wenn die Läsion noch nicht entfernt wurde (Abb.2.8.A, Schritte 5 + 6) (Heyer et al. 2010). Der verbliebene Schaden kann dann über weitere Reparaturprozesse repariert werden.

Wie genau eine Replikation aus der „*chicken foot*“-Struktur heraus wieder aufgenommen wird, ist noch nicht geklärt, eine durch BLM und WRN vermittelte umgekehrte *fork regression* erscheint aber wahrscheinlich (Davies et al. 2007). So belegen neueste *in-vitro*-Studien, dass BLM und WRN in der Lage sind ein Substrat, das eine „*chicken foot*“-Struktur imitiert, in eine aktive Replikationsgabel umzuwandeln (Machwe et al. 2011). Allerdings gibt es auch andere Modelle für eine solche Reaktivierung der Replikation. So wäre auch ein Prozess denkbar, bei dem die „*chicken foot*“-Struktur Mus81-abhängig geschnitten wird um einen einendigen DSB zu erzeugen, der dann über HR-Prozesse repariert werden kann (siehe auch Kapitel 2.4.2) (Osmann + Whitby 2007). Desweiteren wurde ein Modell einer D-Loop-abhängigen Reaktivierung postuliert, welche in Abb.2.9 dargestellt ist. Dabei wird davon ausgegangen, dass das freie DSB-Ende der „*chicken foot*“-Struktur nach einer Resektion in den parentalen Doppelstrang einwandert. Dadurch kommt es zur Ausbildung eines D-Loop und eventuell einer doppelten Holliday-Struktur, durch deren Auflösung die typische Struktur einer Replikationsgabel erreicht wird (Lundin et al. 2002, Petermann + Helleday 2010).

Die zuvor beschriebenen Prozesse beziehen sich auf Ereignisse, bei denen die Replikation durch Schäden auf dem Leitstrang behindert wird. Auf Läsionen des Folgestrangs lassen sich diese Prozesse nur eingeschränkt übertragen. Einige Modelle basieren auf der Annahme, dass eine Blockade der Folgestrang-Synthese zur Ausbildung eines ssDNA-Bereichs an der Replikationsgabel führt. Eine solche Situation wäre vergleichbar mit dem zuvor beschriebenen Fall einer blockierenden Läsion auf dem Leitstrang. Diesen Modellen zufolge könnte durch eine *fork regression* eine modifizierte „*chicken foot*“-Struktur mit einem überhängenden Ende des Leitstranges ausgebildet werden (Osmann + Whitby 2007). Der Prozess des *lesion bypass* sollte aus dieser Struktur allerdings nicht möglich sein, da das freie 5'-Ende des Folgestrangs in dieser Struktur keinen Ausgangspunkt für eine DNA-Synthese darstellt. Der „*chicken foot*“-Struktur kommt hier somit nur eine stabilisierende Funktion zu.

Im Gegensatz zum Leitstrang wird der Folgestrang diskontinuierlich synthetisiert. Das bedeutet, dass die Folgestrang-Synthese nicht durchgängig erfolgt, sondern in kleineren Synthese-Einheiten. Die dabei entstehenden Okazaki-Fragmente werden dann abschließend miteinander verknüpft (Okazaki et al. 1968). Diese Besonderheit im Vergleich zum Leitstrang ermöglicht es der Zelle, die Folgestrang-Synthese hinter einer blockierenden Läsion in Form eines neuen Okazaki-Fragments wieder aufzunehmen. Die Synthese dieses Fragments kann

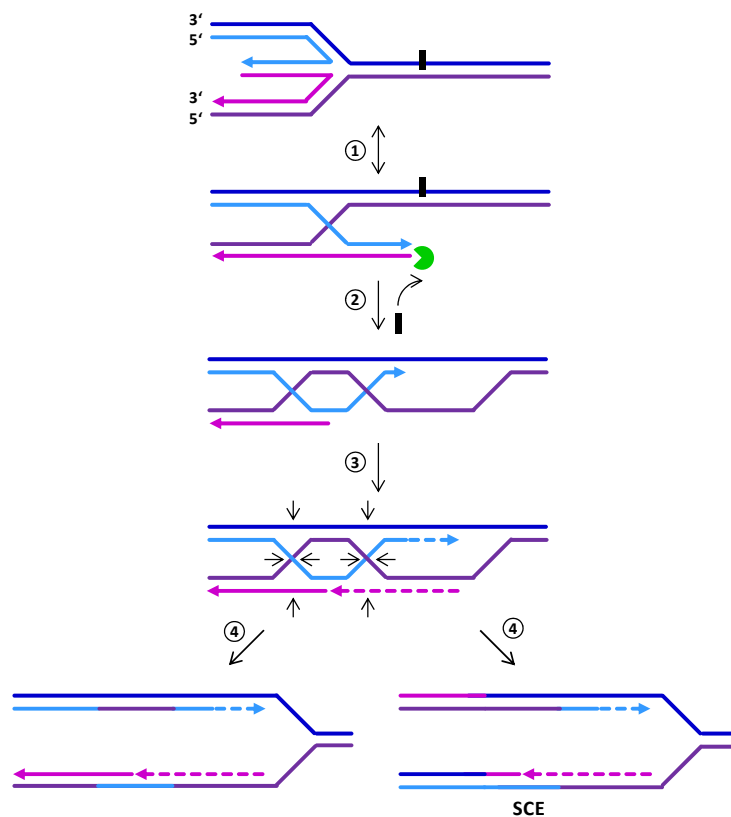


Abb.2.9: D-Loop-abhängige Reaktivierung der Replikation aus einer „chicken foot“-Struktur

Bei einem Replikations-Arrest kann die Replikationsgabel in eine stabilere „chicken foot“-Struktur übergehen. Zum besseren Verständnis sind hier zwei unterschiedliche Darstellungsweisen dieser Struktur gezeigt (1). Eine Möglichkeit zur Re-Initiierung der Replikation nach Entfernen der ursprünglichen Läsion könnte darin bestehen, dass das 5'-Ende des Folgestrangs resektiert wird und das freie 3'-Ende des Leitstrangs eine Stranginvasion in den parentalen Leitstrang vollzieht (2). Dadurch entsteht eine doppelte Holliday-Struktur, in der die parentalen DNA-Stränge als Vorlage für eine DNA-Synthese an den beiden Tochtersträngen dienen (3). Die Auflösung dieser doppelten Holliday-Struktur resultiert in einer aktiven Replikationsgabel. Erfolgt diese Auflösung mittels Resektasen, kann der Prozess mit der Ausbildung von SCE assoziiert sein (4). (frei nach Lundin et al. 2002)

dann bis zur blockierenden Läsion erfolgen, während die Replikationsgabel weiter fortschreiten kann. Dadurch entsteht auf dem Folgestrang ein einzelsträngiger Bereich hinter der Replikationsgabel. (Abb.2.8.B, Schritt 1) (McGlynn + Lloyd, 2002). Abhängig von der Art der Läsion bieten die TLS die Möglichkeit diesen Schaden zu überwinden, so dass anschließend die DNA-Synthese in dem noch zu replizierenden Bereich abgeschlossen werden kann. Daneben kann es aber auch zu Reparaturvorgängen kommen, die mit einer Stranginvasion des freien 3'-Endes des Folgestrangs in den Leitstrang beginnen (Abb.2.8.B, Schritt 2). Hier können die fehlenden Bereiche des Folgestrangs anhand der Vorlage des neusynthetisierten Leitstranges vervollständigt werden (Abb.2.8.B, Schritt 3). Für diesen Prozess wurden unterschiedliche Modelle postuliert. So wäre ein SDSA-ähnlicher Weg denkbar, bei dem der eingewanderte Strang schon nach einer kurzen DNA-Synthese wieder mit dem parentalen Folgestrang paart. Die blockierende Läsion wäre überwunden und die verbleibende ssDNA-Lücke könnte durch Polymerasen aufgefüllt werden (Heyer et al. 2010). In einem zweiten Modell wird dagegen davon ausgegangen, dass der parentale Leitstrang, der während der Stranginvasion durch den Folgestrang verdrängt wird, mit dem ssDNA-Bereich auf dem parentalen Folgestrang paart, was zur Ausbildung einer einfachen Holliday-Struktur führt (Abb.2.8.B, Schritt 2). Nach der DNA-Synthese am eingewanderten Folgestrang wäre somit auch die Ausbildung einer doppelten Holliday-Struktur denkbar (Abb.2.8.B, Schritt 3). Durch

die abschließende Auflösung der einfachen bzw. doppelten Holliday-Struktur wird die Struktur einer aktiven Replikationsgabel wiederhergestellt, wobei dies im Fall der doppelten Holliday-Struktur mit der Ausbildung von SCEs assoziiert sein kann (Abb.2.8.B, Schritt 4 + 5).

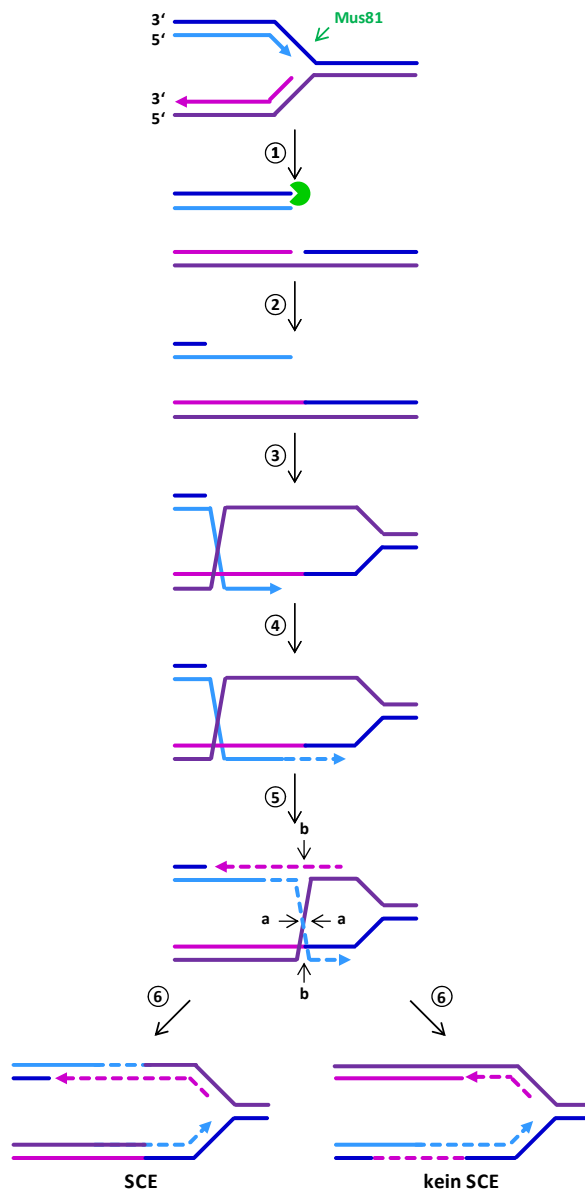
Diese Reparaturprozesse müssen aber nicht zwingend mit der Replikation gekoppelt sein. So gibt es Hinweise, dass die Replikation weiter fortschreiten kann, wenn auf dem Folgestrang ein ssDNA-Bereich hinter der Replikationsgabel erzeugt wurde. Die Reparatur dieser ssDNA-Lücke erfolgt dann postreplikativ (Rupp et al. 1971) vergleichbar mit den zuvor beschriebenen Prozessen (Abb.2.8). Die Auflösung der einfachen oder doppelten Holliday-Struktur führt dann aber nicht zur Re-Initiierung einer intakten Replikationsgabel sondern resultiert in zwei vollständigen Schwesterchromatiden. Für die postreplikative Reparatur von ssDNA-Lücken wurden zudem Modelle postuliert, bei denen nicht das freie 3'-Ende des betroffenen DNA-Strangs die Stranginvasion vollzieht, sondern der noch unreplizierte DNA-Bereich des parentalen Folgestrangs selbst. Dieser paart dabei mit dem komplementären Bereich des parentalen Leitstrangs. In diesem Falle könnte der neusynthetisierte Leitstrang als Vorlage für die DNA-Synthese des unvollständigen Folgestrangs dienen (Heller + Mariani 2006, Feng + Zhang 2011).

2.4.3 Mechanismen der Reparatur kollabierter Replikationsgabeln

Als Kollabieren der Replikationsgabel beschreibt man einen Prozess, bei dem die Replikations-Maschinerie von der Replikationsgabel dissoziiert und der in der Regel mit der Ausbildung ein-endiger DSBs assoziiert ist. Für diese Dissoziation des Replisoms kann es unterschiedliche Ursachen geben. Trifft eine Replikationsgabel beispielsweise auf einen SSB auf dem Leitstrang, so können die DNA-Polymerasen an diesem SSB von der DNA abfallen (*replication fork run-off*). In diesem Fall kommt es zu einer direkten Ausbildung eines ein-endigen DSBs (Strumberg et al. 2000). Eine Dissoziation des Replisoms tritt aber auch bei einem langanhaltenden Replikations-Arrest auf, da die Replikationsgabel nicht auf Dauer stabil ist. Sind die Proteine der Replikations-Maschinerie von der Replikationsgabel dissoziiert, ist diese inaktiv und eine direkte Wiederaufnahme der Replikation ist nicht mehr möglich (Petermann et al. 2010). In diesem Fall erfolgt eine gezielte Induktion eines ein-endigen DSBs an der inaktivierten Replikationsgabel, da der erzeugte DSB die Möglichkeit einer HR-vermittelten Reparatur eröffnet, die eine Re-Initiierung einer aktiven Replikationsgabel ermöglicht (Petermann + Helleday 2010). Diese gezielte Prozessierung inaktiver Replikationsgabeln wird durch den Endonuklease-Komplex Mus81-Eme1 vermittelt (Hanada et al. 2007, Froget et al. 2008).

Die an kollabierten Replikationsgabeln entstandenen ein-endigen DSBs müssen über einen HR-Prozess repariert werden. Eine Reparatur dieser Schäden über den NHEJ-Weg ist nicht

möglich, da ein zweites Bruchende für eine direkte Ligation fehlt. Der auf die Reparatur ein-
 endiger DSBs spezialisierte Unterweg der HR wird als *break-induced replication* (BIR) be-
 zeichnet und ist in Abb.2.10 dargestellt.



**Abb.2.10: Reparatur eines ein-
 endigen DSBs über den Weg der
 break-induced replication (BIR)**

Wird ein Replikations-Arrest über einige Stunden aufrechterhalten, kollabieren die Replikationsgabeln. Dabei dissoziieren die Proteine des Replisoms von der Replikationsgabel und diese wird dadurch inaktiviert. Zur Reaktivierung wird die Replikationsgabel (oder die „chicken foot“-Struktur) gezielt durch den Endonuklease-Komplex Mus81-Eme1 geschnitten und ein ein-endiger DSB wird erzeugt (1). Dieser ein-endige DSB wird resektiert und verbleibende ssDNA-Bereiche auf dem intakten Strang werden geschlossen (2). Das entstandene freie 3'-Ende kann anschließend in den homologen Bereich auf dem intakten DNA-Doppelstrang einwandern (3) und anhand der Vorlage dieses Strangs verlängert werden (4). Für die Synthese des zweiten Stranges gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen kann der eingewanderte Strang nach und nach wieder aus der Heteroduplex-DNA abgelöst werden und selbst als Vorlage für die DNA-Synthese dienen. Zum anderen kann die Strangsynthese aber auch an dem verdrängten, parentalen Strang erfolgen (5). Die entstandene einfache Holliday-Struktur kann abschließend durch Resolvasen aufgelöst werden. Abhängig davon, wie dies erfolgt, kann dies zur Ausbildung von SCEs führen (6). (frei nach Petermann und Helleday 2010)

Im Zuge des BIR-Prozesses wird der DSB resektiert, so dass das freie 3'-Ende anschließend in den intakten DNA-Doppelstrang einwandern kann. Eine Besonderheit dieses Weges ist, dass der durch den D-Loop verdrängte DNA-Strang nicht mit einem komplementären Strang paaren kann. Der Prozess des *second end capture* findet hier also nicht statt und es kann keine doppelte Holliday-Struktur ausgebildet werden. Der verdrängte Strang kann aber dennoch als Vorlage für eine Neu-Synthese des Zweitstrangs dienen (Petermann + Helleday

2010). Alternativ zu dieser Theorie ist aber auch ein SDSA-ähnlicher Prozess denkbar, bei dem der eingewanderte Strang wie beim „bubble migration“-Prozess ständig wieder aus der Heteroduplex-DNA gelöst wird und selbst als Vorlage für die Synthese des Zweitstrangs dient (Abb.2.10, Schritt 5) (Paques + Haber 1999). Durch eine abschließende Auflösung der einfachen Holliday-Struktur, welche potentiell mit der Ausbildung von SCEs assoziiert sind kann, wird die Struktur einer intakten und funktionalen Replikationsgabel wiederhergestellt. Hier kann die Replikation dann soweit fortgesetzt werden, bis die erzeugte Replikationsgabel auf die nächste aktive Replikationsblase trifft. Solche Prozesse zur Etablierung Rekombinations-initiiertter Replikationsgabeln wurden in *E. coli* und im Bakteriophagen T4 bereits gut charakterisiert (Kogoma 1997, Mosig 1987).

Vor Kurzem wurde ein weiterer Weg zur Reaktivierung kollabierter Replikationsgabeln postuliert, welcher unabhängig vom BIR erfolgt (Petermann et al. 2010). In dieser Studie, die auf der Analyse einzelner Replikationsgabeln basiert, wurde ein deutlicher Anstieg an neuen Replikationsereignissen in der Nähe von kollabierten Replikationsgabeln beobachtet. Daraus wurde geschlossen, dass die Zellen gezielt neue Replikationsvorgänge an den Replikationsursprüngen (*origin of replication*) initiieren, die benachbart zur der Stelle der kollabierten Replikationsgabel liegen. Schreitet die neu-initiierte Replikationsgabel nun bis zum Ort des ein-endigen DSBs fort, wird durch die Replikation ein zweites, passendes Bruchende geschaffen (Abb.2.11). Dadurch wird eine Reparatur des ursprünglich ein-endigen DSBs durch HR-Mechanismen für zwei-endige DSBs (SDSA oder dHJ-HR) möglich. Theoretisch wäre hier sogar eine Verknüpfung der beiden Bruchenden durch eine NHEJ-Prozess denkbar (Petermann et al. 2010).

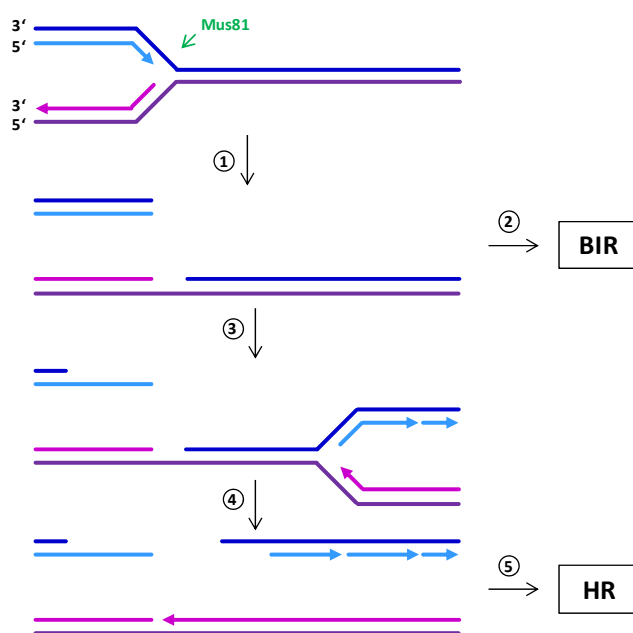


Abb.2.11: Reparatur eines ein-endigen DSBs mit Hilfe einer zweiten Replikationsgabel

Neben dem Weg der BIR (2) existiert eine weitere Möglichkeit zur Reparatur ein-endiger DSBs, die aus einer Mus81-Eme1-vermittelten Prozessierung inaktivierter Replikationsgabeln hervorgegangen sein können (1). Bei diesem BIR-unabhängigen Weg wird die Replikation an einem benachbarten Replikations-Ursprung initiiert. Die neu-initiierte Replikationsgabel schreitet dann bis zur Stelle des ein-endigen DSBs fort (3), wodurch ein zweites Bruchende ausgebildet wird (4). Der so erzeugte zwei-endige DSB kann nun über unterschiedliche HR-Prozesse (SDSA oder dHJ-HR) repariert werden (5). (frei nach Petermann und Helleday 2010)

2.5 Die DNA-schädigende Wirkung von Methylmethansulfonat (MMS)

Im vorherigen Kapitel wurde beschrieben, wie Läsionen in der DNA die Replikation blockieren können und welche komplexen Reparaturmechanismen existieren um mit diesen Störungen der Replikation umzugehen. Die Anfälligkeit der Replikationsgabel für solche Störungen stellt einen wichtigen Ansatzpunkt für chemotherapeutische Behandlungen dar. Ein Charakteristikum von Tumorzellen ist ihre starke Proliferation. Gerade bei Tumoren in teilungsarmen Geweben ermöglichen Therapien, die auf eine Störung der Replikation abzielen, eine gezielte Schädigung der Krebszellen, während die umgebenden, gesunden Zellen kaum beeinträchtigt werden. Daher kommen häufig Medikamente zum Einsatz, die zur Ausbildung Replikations-abhängiger DNA-Schäden führen. Wichtige Vertreter sind dabei alkylierende Agenzien, deren Wirkung auf der chemischen Modifizierung von DNA-Basen beruht, die das Fortschreiten der Replikationsgabel stören.

2.5.1 MMS-induzierte Basenmethylierungen

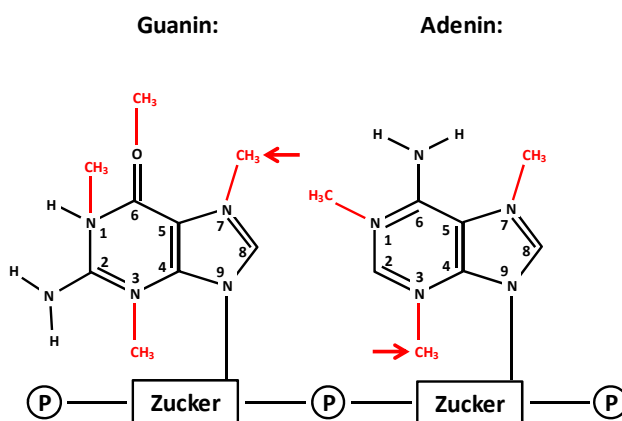


Abb.2.12: Methylierungsstellen von MMS in den DNA-Basen Guanin und Adenin

Die meisten Stickstoff-Atome in Guanin und Adenin sowie das exocyclische Sauerstoff-Atom in Guanin stellen potentielle Methylierungsstellen für MMS dar. Die möglichen Methylierungen sind in rot dargestellt, mit Pfeilen gekennzeichnet sind die beiden am häufigsten auftretenden Addukte N7-Methylguanin (82 %) und N3-Methyladenin (11 %). Als am toxischsten wirkender Schaden gilt O6-Methylguanin, was im Gegensatz zu anderen alkylierenden Agenzien von MMS aber kaum (~0,3 %) induziert wird (frei nach Wyatt and Pittman 2006).

Gut untersuchte alkylierende Substanzen sind Methylmethansulfonat (MMS) und N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG), die Stickstoff- und Sauerstoff-Atome in den Nukleinsäuren der DNA methylieren können. Dies erfolgt bei MNNG in einer unimolekularen, bei MMS in einer bimolekularen nukleophilen Substitutions-Reaktion. Dementsprechend wird MNNG den S_N1 - und MMS den S_N2 -Alkylierungen zugordnet, welche sich in ihren Substratspezifitäten unterscheiden (Wyatt + Pittman 2006). S_N2 -Alkylierungen besitzen eine hohe Affinität für die Stickstoff-Atome in Purin-Ringen, deshalb treten nach MMS-Behandlung hauptsächlich N-Methylierungen in Guanin- und Adenin-Basen auf (Abb.2.12). Dabei stellt N7-Methylguanin mit 82 % die am häufigsten erzeugte Läsion dar, gefolgt von N3-Methyladenin mit 11 %. Die übrigen möglichen Basenmethylierungen treten deutlich seltener

auf (Beranek 1990). Ein besonders schwerwiegender Basenschaden ist O6-Methylguanin. Während der ersten S-Phase führt diese methylierte Base zur Ausbildung einer Punktmutation, da sie während der Replikation fälschlicherweise mit einem Thymidin anstelle eines Cytosins gepaart wird. Über den Mechanismus der *Mismatch*-Reparatur führt diese Veränderung darüber hinaus in der zweiten S-Phase zur Ausbildung Replikations-assoziiierter DNA-Schäden. O6-Methylguanin wirkt daher sowohl mutagen als auch toxisch (Loechler et al. 1984, Goldmacher et al. 1986, Roos et al. 2009). MNNG erzeugt diesen Basenschaden relativ häufig (7 % der Basenschäden) und die toxische Wirkung von MNNG wird vor allem dieser hohen Frequenz an O6-Methylguanin zugeschrieben. Im Gegensatz dazu macht O6-Methylguanin nur etwa 0,3 % der MMS-induzierten Basenmethylierungen aus (Beranek 1990) und scheint kaum zur DNA-schädigenden Wirkung von MMS beizutragen.

2.5.2 Reparatur MMS-induzierter Basenmethylierungen

In *E. coli* werden die durch Alkylanzien erzeugten, methylierten DNA-Basen über die Prozesse der sogenannten *Adaptive Response* repariert (Samson + Cairns 1977). Diese Bezeichnung beschreibt die Vorgänge von fünf Proteinen, welche zusammen elf unterschiedliche Basenmethylierungen beheben können (Sedgwick + Lindahl 2002, Falnes 2004). Die Reparaturmechanismen in Säugerzellen unterscheiden sich von den Prozessen der *Adaptive Response*, dennoch weisen die beteiligten Faktoren sehr ähnliche enzymatische Aktivitäten auf (Wyatt + Pittman 2006). Die beteiligten Enzyme besitzen dabei starke Substratspezifitäten, so dass jede Basenmethylierung nur über einen der existierenden Reparaturwege behoben wird. So ist das Enzym O6-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) zum Beispiel spezifisch für die Reparatur von O6-Methylguanin verantwortlich. MGMT entfernt dabei die Methylierung in einer sogenannten „*Suicide*“-Reaktion, indem es die Methylgruppe vom Sauerstoff-Atom löst und kovalent auf einen Cystein-Rest überträgt, wodurch das Enzym irreversibel inaktiviert wird (Friedberg et al. 2006). MGMT-defiziente Zellen reagieren sehr empfindlich auf eine Behandlung mit MNNG, sind aber kaum sensitiv gegenüber MMS, was auf den deutlich höheren Anteil an induziertem O6-Methylguanin nach MNNG zurückzuführen ist (Tsuzuki et al. 1996, Glassner et al. 1999). Ebenfalls beteiligt an der Reparatur methylierter Basen sind die Mitglieder der AlkB-Proteinfamilie, die mehrere Homologe in Säugern besitzt. Diese Proteine besitzen eine N-Methyl-Dioxygenase-Aktivität und können dadurch die Methylgruppen an einigen Stickstoff-Atomen (z. B. bei N1-Methyladenin und N1-Methylguanin) entfernen (Drablos et al. 2004, Falnes 2004). Im Gegensatz zur Reaktion von MGMT handelt es sich hierbei um einen reversiblen Prozess.

Die wichtigste Funktion bei der Reparatur MMS-induzierter Basenmethylierungen kommt der Gruppe der N-Methylpurin-DNA-Glykosylasen zu. Diese Enzyme schneiden die methylierten

Basen aus der DNA und führen diese geschädigten Stellen somit der Basen-Exzisionsreparatur (BER) zu, deren Prozesse im nächsten Abschnitt genauer beschrieben werden. Mit N7-Methylguanin, N3-Methyladenin und N3-Methylguanin machen die Substrate der Glykosylasen fast 95 % der durch MMS erzeugten Basenmethylierungen aus. Die große Bedeutung der BER bei der Reparatur dieser Schäden wird auch durch viele Studien verdeutlicht, die einer Hypersensitivität von Zellen mit Defekten in der BER (z. B. XRCC1- und Pol β -defiziente Zellen) gegenüber MMS beschrieben haben (Thompson et al. 1982, Sobol et al. 1996).

2.5.3 Die Basen-Exzisionsreparatur (BER)

In jeder menschlichen Zelle treten pro Tag bis zu 10.000 spontane Basenschäden auf, die über den Weg der BER behoben werden (Baute + Depicker 2008). Neben spontanen Basenverlusten zählen hierzu auch Desaminierungen, Alkylierungen und Oxidationen von Nukleobasen. Solche Addukte können zu Punktmutationen und somit zu einer Veränderung der genetischen Information führen. Desweiteren kann auch die Replikation der DNA während der S-Phase durch solche Schäden gestört werden (siehe Abschnitt 2.4.1). Bei dieser hohen Frequenz an spontanen Basenschäden ist es nicht überraschend, dass der Prozess der BER essentiell für das Überleben der Zelle ist. Es sind keine Fälle von Menschen mit einem Defekt in der BER bekannt und in Mäusen wirken Nullmutationen in wichtigen BER-Faktoren wie Pol β oder XRCC1 embryonal letal (Gu et al. 1994, Tebbs et al. 1999).

Die BER kann über zwei unterschiedliche Wege ablaufen, den Weg der *short-patch*-BER, welcher in Säugern klar dominiert (Friedberg et al. 2006), und den selten auftretenden Weg der *long-patch*-BER. Im initialen Schritt beider BER-Subwege werden die spontan oder durch chemische Agenzien modifizierten Basen von spezifischen Glyosylasen erkannt und vom Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA abgelöst, was zur Ausbildung einer abasischen Stelle führt (Abb.2.13). Daraufhin erzeugt die apurinische/apyrimidinische Endonuklease 1 (APE1) an dieser Stelle einen SSB mit einem 3'-OH- und einem 5'-Desoxyribosephosphat-Rest (5'-dRP). Während des Prozesses der *short-patch*-BER wird dieser SSB durch die Polymerase Pol β aufgefüllt. Über eine zusätzliche 5'-dRP-Lyase-Aktivität entfernt Pol β außerdem den 5'-dRP-Rest und erzeugt damit ein freies 5'-Phosphatende. Diese Aktion wird als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt während der *short-patch*-BER angesehen (Srivastava et al. 1998, Sobol et al. 2000) und ermöglicht die abschließende Ligation der DNA durch die DNA-Ligasell α . In manchen Fällen ist Pol β nicht in der Lage ein freies 5'-Phosphatende zu erzeugen, zum Beispiel wenn die 5'-dRP-Gruppe oxidiert oder reduziert vorliegt. Unter diesen Umständen wird der Weg der *long-patch*-BER aktiviert, der zusätzliche Proteine wie PARP, PCNA oder FEN-1 benötigt (Caldecott 2003). Hierbei synthetisiert Pol β einen längeren DNA-Strang (2 – 15 Nukleotide) und verdrängt damit einen Teil des alten DNA-Strangs. Diese Funktion kann auch durch die PCNA-abhängigen Polymerasen Pol δ und Pol ϵ

übernommen werden (Fortini et al. 1998). Abschließend wird der verdrängte Strang durch die *flap endonuclease 1* (FEN-1) abgeschnitten (Prasad et al. 2000) und der noch vorhandene SSB wird mittels LigI geschlossen (Levin et al. 2000). Die meisten Faktoren der BER sind auch an der Reparatur von SSBs beteiligt. Zwar sind hier andere Proteine für die Detektion eines SSBs wichtig (PARP1, PNK1, XRCC1), die Reparatur erfolgt dann aber in der Regel über den *short-patch*-Weg der BER (Caldecott 2003).

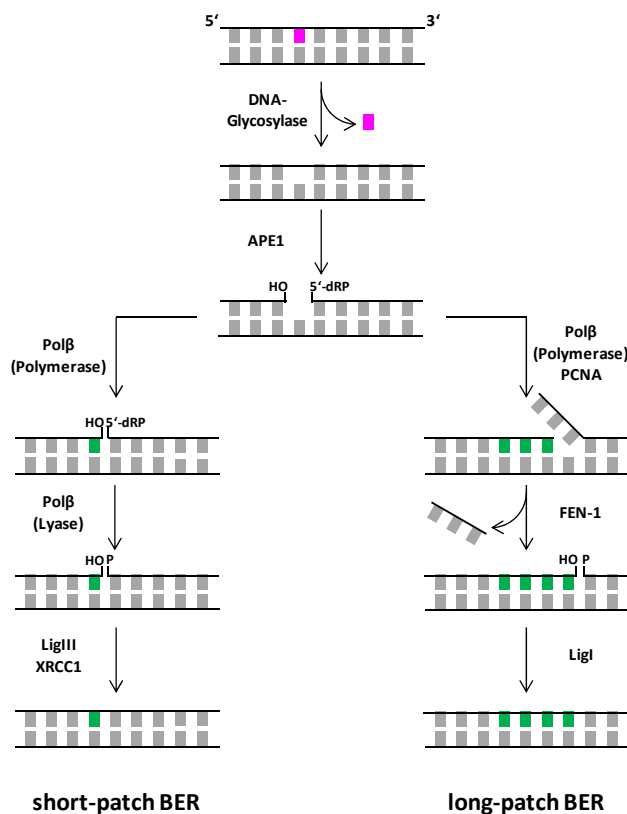


Abb.2.13: Die Basen-Exzisionsreparatur
Spezifische Glykosylasen erkennen geschädigte Basen (pink), entfernen diese aus der DNA und erzeugen eine abasische Stelle. Das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA wird an dieser Stelle durch APE1 geschnitten, wobei ein 3'-OH- und ein 5'-dRP-Rest entstehen. In dem dominierenden Weg der *short-patch*-BER (links) füllt Polβ die abasische Stelle mit Hilfe ihrer Polymerase-Aktivität mit einem Nukleotid (grün) auf. Mit ihrer Lyase-Aktivität entfernt Polβ zusätzlich den 5'-dRP-Rest und ermöglicht dadurch die abschließende Ligation des SSBs durch den LigIII/XRCC1-Komplex. Die meisten anderen Faktoren dieses Weges interagieren ebenfalls mit XRCC1, das somit auch für weitere Schritte der BER wichtig zu sein scheint. Im Weg der *long-patch*-BER (rechts) synthetisiert Polβ einen längeren Nukleotid-Strang und verdrängt damit ein kurzes Stück ungeschädigter DNA. Dieser Weg benötigt zusätzliche Faktoren wie PCNA oder PARP1 und Polβ. Das verdrängte DNA-Stück wird durch FEN-1 abgeschnitten und LigI übernimmt den abschließenden Ligationsschritt. (frei nach Wyatt and Pittman 2006).

Ein weiterer wichtiger Faktor während der BER ist XRCC1. Zunächst nur als Interaktionspartner von LigIII identifiziert (Caldecott et al. 1995), konnten inzwischen Interaktionen von XRCC1 mit fast allen anderen BER-Faktoren wie Polβ (Caldecott et al. 1996), APE1 (Vidal et al. 2001) oder PNK1 (Whitehouse et al. 2001) nachgewiesen werden. Im CHO-System war es möglich, XRCC1-defiziente Zelllinien zu generieren. Diese Zellen zeigen eine Hypersensitivität gegen MMS und andere Alkylanzien. Zudem konnte in ihnen eine klare Beeinträchtigung im SSB-Reparaturverhalten nachgewiesen werden (Thompson et al. 1982, Zdzienicka et al. 1992). Die große Zahl an Interaktionspartnern von XRCC1 machen es schwierig die Bedeutung von XRCC1 an den einzelnen Schritten der BER zu beurteilen. Die Beobachtung, dass die SSB-Reparatur in Abwesenheit von XRCC1 zwar stark verlangsamt, aber nicht komplett unterbunden ist (Thompson et al. 1982), führte zu der Überlegung, dass

XRCC1 die Funktion eines Mediators während der BER übernehmen könnte, der die effektive Abfolge der einzelnen Schritte koordiniert und fördert (Caldecott 2003).

2.5.4 Zusammenhang einer MMS-Behandlung mit der Induktion von DSBs

Die Frage, ob MMS zu Replikations-assoziierten DSBs führt, wurde bis jetzt noch nicht abschließend beantwortet. In einigen Studien wurde eine Induktion von γ H2AX-Foci nach einer MMS-Behandlung beschrieben (Pascucci et al. 2005, Zhou et al. 2006). Dies könnte ein Zeichen für eine MMS-vermittelte Ausbildung von DSBs sein. Die Beobachtung, dass diese MMS-induzierten γ H2AX-Foci in nicht-proliferierenden Zellen nicht auftreten, unterstützt dabei die Annahme, dass die Erzeugung von DSBs nach einer MMS-Behandlung Replikations-abhängig erfolgt (Staszewski et al. 2008). Diese Theorie wird durch Studien bekräftigt, die eine Kolo-kalisation MMS-induzierter γ H2AX-Foci mit Replikations-Markern beschreiben (Staszewski et al. 2008, Groth et al. 2010).

Wie genau die MMS-induzierten Basenmethylierungen zur Ausbildung Replikations-assoziiierter DSBs führen, ist noch nicht aufgeklärt. Hier sind unterschiedliche Prozesse denkbar. So ist bekannt, dass einige der durch MMS erzeugten, methylierten Basen die Replikation blockieren können (Larson et al. 1985, Engelward et al. 1998). Die dadurch arretierten Replikationsgabeln könnten, wenn der Arrest zu lange andauert, kollabieren und somit zur Ausbildung ein-endiger DSBs führen. Darüber hinaus können aber auch die während der BER erzeugten, temporären abasischen Stellen und SSBs zur Erzeugung ein-endiger DSBs beitragen, wenn sie mit Replikationsgabeln interferieren. Hier wäre ein Prozess des *replication fork run-off*, wie er nach CPT beschrieben wurde (Strumberg et al. 2000), denkbar. Unterstützt wird eine solche Annahme durch eine Reihe von Studien, in denen die Wirkung von MMS auf BER-Mutanten untersucht wurde, die SSBs akkumulieren (z. B. XRCC1- und Pol β -defiziente Zellen). Die extreme Empfindlichkeit dieser Zelllinien gegenüber MMS bekräftigt die Annahme, dass die erzeugten SSBs zur DNA-schädigenden Wirkung von MMS beitragen (Thompson et al. 1982, Sobol et al. 1996, Sobol et al. 2003). Diese Wirkung könnte auf die Ausbildung Replikations-abhängiger DSBs zurückzuführen sein.

Unabhängig davon, ob die nach MMS postulierten ein-endigen DSBs auf arretierte Replikationsgabeln oder auf die Wechselwirkung der Replikation mit SSBs zurückzuführen sind, sollten diese Schäden für eine Reparatur über den HR-Weg determiniert sein. Diese Annahme wird von einer Vielzahl an Studien unterstützt, in denen eine Hypersensitivität unterschiedlicher HR-Mutanten gegenüber MMS beschrieben wurde (Hinz et al. 2006, Smiraldo et al. 2005). NHEJ-defekte Zelllinien reagieren dagegen kaum empfindlich gegenüber MMS (Lundin et al. 2005). Eine Beteiligung der HR an der Reparatur MMS-induzierter Schäden wird zudem durch Studien verdeutlicht, die eine starke Zunahme an SCEs nach einer MMS-Behandlung beschrieben haben (Kaina 2004).

2.6 Zielsetzung

Die DNA-schädigende Wirkung von alkylierenden Agenzien wie MMS wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht. Eine zunehmende Zahl an Studien erbrachte dabei Hinweise, dass sich die schädigende Wirkung von MMS vor allem während der S-Phase des Zellzyklus manifestiert. Zusammen mit Beobachtungen, dass HR-defiziente Zelllinien eine vergleichbare Hypersensitivität gegenüber MMS zeigen wie gegenüber anderen S-Phase-schädigenden Agenzien (z. B. HU, CPT), führte dies zur Annahme, dass MMS Replikations-abhängige DNA-Schäden erzeugt. Viele der bisher durchgeführten Studien ermöglichen aber keine Aussagen darüber, ob Zellzyklus-abhängige Prozesse bei der Wirkung von MMS eine Rolle spielen. So wurde häufig das zelluläre Überleben als ein Maß für die Schädigung der Zelle durch MMS oder andere Alkylanzien herangezogen. Solche Untersuchungen erlauben aber nur eine Beurteilung der gesamten Zellpopulation.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die schädigende Wirkung von MMS mit Hilfe von Zellzyklus-spezifischen Methoden untersucht werden um zu überprüfen, ob ein direkter Zusammenhang von MMS-induzierten DNA-Schäden und der Replikation der DNA existiert. Eine Untersuchung auf Einzelzell-Ebene sollte dabei mit Hilfe der γ H2AX-Immunfluoreszenz erreicht werden. γ H2AX-Foci sind ein etablierter Marker für strahleninduzierte DSBs in der G1- und G2-Phase. Zwar gibt es erste Studien, die eine Ausbildung von γ H2AX-Foci nach Behandlung mit MMS beschreiben, jedoch wurden diese Untersuchungen nicht Zellzyklus-spezifisch durchgeführt. In dieser Arbeit sollte ein methodischer Ansatz etabliert werden, der eine S-Phase-spezifische Analyse von γ H2AX-Foci erlaubt. Damit sollte nicht nur überprüft werden, ob die Induktion von γ H2AX-Foci nach MMS auf die S-Phase beschränkt ist, sondern auch das Reparaturverhalten MMS-induzierter Schäden sollte mit diesem Ansatz genauer charakterisiert werden, um bessere Kenntnisse über die ablaufenden Reparaturprozesse zu erlangen. Durch die S-Phase-spezifische γ H2AX-Analyse nach MMS sollte der Beitrag der beiden Reparaturwege HR und NHEJ nun genau bestimmt werden. Zudem sollten die erhaltenen Ergebnisse mit dem Reparaturverhalten strahleninduzierter Schäden verglichen werden.

Als Quelle für Replikations-assoziierte Schäden nach MMS werden sowohl die direkt durch MMS induzierten Basenmethylierungen als auch die während der Reparatur dieser Schäden entstehenden SSBs diskutiert. In dieser Arbeit sollte anhand der Untersuchung von BER-Mutanten, die nach MMS eine Akkumulation an SSBs zeigen, eine genauere Abschätzung darüber getroffen werden, welchen Beitrag die MMS-induzierten Basenmodifikationen und die während der BER auftretenden SSBs zur DNA-schädigenden Wirkung von MMS leisten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

10 x PBS Instamed-Pulver	(Biochrom AG, Berlin)
Aceton	(Roth, Karlsruhe)
BrdU (1 mM in PBS)	(BD Pharmingen™, Heidelberg)
BSA (Bovines Serumalbumin)	(AppliChem, Darmstadt)
DAPI (in MilliQ)	(Sigma-Aldrich-Aldrich, Steinheim)
DMSO	(Roth, Karlsruhe)
DNase (1 mg/ml in 50% Glycerin)	(Roche, Mannheim)
EDTA	(Roth, Karlsruhe)
EdU (10 mM in DMSO, Click-iT™ Kit)	(Invitrogen, Karlsruhe)
Ethanol (reinst > 99,8%)	(AppliChem, Darmstadt)
Ethanol (vergällt)	(Roth, Karlsruhe)
FCS (Fötales Kälberserum)	(Biochrom AG, Berlin)
Formaldehyd (37%)	(Roth, Karlsruhe)
HCl (37 %)	(Roth, Karlsruhe)
HiPerFect® Transfection Reagent	(Quiagen, Hilden)
Methanol	(Roth, Karlsruhe)
Mounting Medium (Vectashield®)	(Vector Laboratories, Burlingame, USA)
MMS (99%)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Natrium-Tetraborat-Decahydrat	(Roth, Karlsruhe)
Propidiumiodid (0,1 mg/ml in 1xPBS)	(Fluka Chemika AG, Buchs, CH)
RNaseA (10 mg/ml in PBS, hitzeinaktiviert)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Triton X-100	(Roth, Karlsruhe)
Trypsin	(Biochrom AG, Berlin)
Tween®20	(Sigma-Aldrich, Steinheim)

Inhibitoren

Aphidicolin (1 mg/ml in DMSO)	(Calbiochem/Merck, Darmstadt)
ATM-Inhibitor (10 mM in DMSO)	(Calbiochem/Merck, Darmstadt)
Colcemid (100 µg/ml in DMSO)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
DNA-PK-Inhibitor (NU7026, 10 mM in DMSO)	(Tocris, Ellisville, USA)
Koffein (50 mM in PBS)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Nocodazol (500 µg/ml in DMSO)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)

3.1.2 Medien und Zusätze für Zellkultur

Medien

Dulbecco's MEM Medium	(Biochrom AG, Berlin)
HAMS F-10-Medium	(Biochrom AG, Berlin)
Minimal Essential Medium (MEM) Earle	(Biochrom AG, Berlin)
RPMI-Medium	(Biochrom AG, Berlin)

Zusätze

G418	(Calbiochem/Merck, Darmstadt)
Non-essential amino acids (NEAA)	(Biochrom AG, Berlin)
Penicillin/Streptomycin (100 units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin)	(Biochrom AG, Berlin)

3.1.3 Lösungen

Zellkultivierung

Einfriermedium	60 % FCS 20 % Zellkulturmedium 20 % DMSO
Trypsin-EDTA-Lösung	0,02 % Trypsin-Lösung (2,5 %) 0,05 % 0,5 mM Na ₂ -EDTA, pH 8 in 1xPBS

Immunfluoreszenz

1xPBS	10xPBS 1:10 in MilliQ
1xPBS/1%FCS	10xPBS 1:10 in MilliQ + 1 % FCS
Fixierlösung	2 % Formaldehyd in 1xPBS
Permeabilisierungslösung	0,2 % Triton X-100 in 1xPBS/1%FCS
Blockierlösung	5 % BSA in 1xPBS/1%FCS
Click-IT™ reaction cocktail (500 µl)	430 µl 1xClick-IT™ reaction buffer 20 µl CuSO ₄ 1,2 µl Alexa Fluor® azide 50 µl reaction buffer additive (1:10 in MilliQ)

DAPI-Lösung	0,2 µg/ml DAPI in 1xPBS
FACS-Analysen	
Denaturierungslösung	2 M HCl in 1xPBS
Neutralisierungslösung	3,81 g Natrium-Tetraborat-Decahydrat in 100 ml MilliQ, pH 8,5
Propidiumiodid-Lösung	10 % Propidiumiodid-Stammlösung 5 % RNaseA (10 µg/ml) 85 % 1xPBS

3.1.4 Antikörper und Kits

Primärantikörper

anti-53BP1, mouse monoclonal IgG	(Millipore GmbH, Schwalbach)
anti-53BP1, rabbit polyclonal IgG	(Biomol, Hamburg)
anti-BrdU, mouse monoclonal, FITC-conjugated (FITC-conjugated BrdU Antibody Set)	(Becton Dickinson, Heidelberg)
anti-BrdU, mouse monoclonal IgG (5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling&Detection Kit I)	(Roche, Mannheim)
anti-γH2AX (Ser 139), mouse monoclonal IgG	(Millipore GmbH, Schwalbach)
anti-γH2AX (Ser 139), rabbit polyclonal	(Abcam, Cambridge, UK)
anti-phosphoH3 (Ser 10), rabbit polyclonal	(Millipore GmbH, Schwalbach)
anti-Rad51 (ab63801), rabbit polyclonal IgG	(Abcam, Cambridge, UK)

Sekundärantikörper

goat anti-mouse IgG AlexaFluor488®	(Invitrogen, Karlsruhe)
goat anti-mouse IgG AlexaFluor594®	(Invitrogen, Karlsruhe)
goat anti-rabbit IgG AlexaFluor488®	(Invitrogen, Karlsruhe)
goat anti-rabbit IgG AlexaFluor594®	(Invitrogen, Karlsruhe)

Kits

5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling & Detection Kit I	(Roche, Mannheim)
Click-iT™ EdU Alexa Fluor®594 Imaging Kit	(Invitrogen, Karlsruhe)
Click-iT™ EdU Alexa Fluor®647 Imaging Kit	(Invitrogen, Karlsruhe)

3.1.5 siRNA

Alle eingesetzten siRNAs wurden von der Firma Quiagen bezogen und in Stammlösungen mit einer Konzentration von 20 µM angesetzt. Die verwendeten Sequenzen sind in Tab.3.1 aufgeführt. Verwendet wurden hierbei Sequenzen, die den humanen Gensequenzen entsprechen, aus weniger als 30 Nukleotiden bestanden und einen GC-Gehalt von weniger als 50% aufwiesen.

Tab.3.1: verwendete siRNA-Sequenzen für eine spezifische Depletion der angegebenen Faktoren

siRNA	Sequenz
Control	5' AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT 3'
53BP1	5' AAG CCA GGT TCT AGA GGA TGA 3'
BRCA2	5' TTG GAG GAA TAT CGT AGG TAA 3'
DNA-PKcs	5' CTC GTG TAT TAC AGA AGG AAA 3'
Ku80	5' AAG ACA GAC ACC CTT GAA GAC 3'
MDC1	5' CCA GAA ATC TTT ATG AAT AAA 3'
Rad51	5' AAG GGA ATT AGT GAA GCC AAA 3'

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser (Ø 12 mm)	(Roth, Karlsruhe)
Deckgläser (für Neubauer-Zählkammer, rechteckig)	(Roth, Karlsruhe)
Einfrierröhrchen CryoPure (2ml)	(Sarstedt, Nümbrecht)
Latexhandschuhe Derma Clean	(Ansell, Brüssel, BEL)
Objektträger Superfrost® (76x26 mm)	(Roth, Karlsruhe)
	(Menzel-Gläser, Braunschweig)
Pasteurpipetten (Glas)	(Roth, Karlsruhe)
Pasteurpipetten (Kunststoff)	(Roth, Karlsruhe)
Pipettenspitzen	(Sarstedt, Nümbrecht)
Pipettenspitzen (gestopft)	(Roth, Karlsruhe)
Reaktionsgefäße SafeSeal (1,5 ml und 2 ml)	(Roth, Karlsruhe)
Rundbodenröhrchen BD Falcon™ (5 ml)	(BD Biosciences, Heidelberg)
Wischtücher KimWipes	(Neolab, Heidelberg)
Zellkulturflaschen (25 cm ² und 75 cm ²)	(Biochrom AG, Berlin)
Zellkulturschalen (8,8 cm ² und 21,5 cm ²)	(Biochrom AG, Berlin)
Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	(Biochrom AG, Berlin)

3.1.7 Geräte

Dosimeter	Diados	(PTW Freiburg)
Durchflusszytometer	FACS Scan TM	(Becton Dickinson, Heidelberg)
	FC500	(Beckman Coulter, Krefeld)
Durchlicht-Mikroskope	Eclipse TS100	(Nikon, Düsseldorf)
Einfrierbox	NrFreeze	(Nalgene, Roskilde, DK)
Fluoreszenzmikroskope	Axioplan 2	(Zeiss, Jena)
	Axiovert 200M	(Zeiss, Jena)
Kühl- und Gefrierschränke		(Liebherr, Kirchdorf an der Iller)
Kühltruhe (-80°C)	Hera freeze	(Thermo Scientific, Langenselbold)
Kühlzentrifugen	5804R + Rotor A-4-44	(Eppendorf, Hamburg)
	5810R + Rotor A-4-81	(Eppendorf, Hamburg)
Magnetrührer	Varimag [®]	(H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
	MRH-Szandard	(Heidolph Instruments GmbH & CoKG, Schwabach)
pH-Meter	pMX2000	(WTW, Weilheim)
Pipetten	Pipetman: 2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	(Gilson, Middleton, USA)
Pipettierhilfe	Pipetboy	(Integra, Fernwald)
Reinstwasseranlage	Astacus BI µS MT	(MembraPure GmbH, Bodenheim)
Röntgenröhren	MCN 165/796704	(Philips, Hamburg)
	Isovolt Titan E	(GE, München)
Sterilwerkbänke	Hera safe	(Thermo Scientific, Langenselbold)
Stickstofftank	Locator 8 Plus	(Thermolyne, Dubuque, USA)
Tiefkühltruhe (-80°C)	Hera freeze	(Thermo Scientific, Langenselbold)
Tischzentrifugen	Mini-Zentrifuge Spectrafuge [®]	(Neolab, Heidelberg)
Vortexer	Genie 2	(Scientific Industries, Bohemia, USA)
Waagen	TE1502S und TE153S-DS	(Sartorius mechatronics, München)
Wasserbad	WB14	(Mettler, Schwabach)
Zählkammer	Neubauer-improved	(Marienfeld GmbH & CoKG, Lauda-Koenigshofen)
Zellkultur-Inkubatoren	Hera cell 240	(Thermo Scientific, Langenselbold)

3.1.8 Computerprogramme

Adobe Acrobat Reader	(Adobe Inc., San Jose, USA)
CellQuest	(Becton Dickinson, Heidelberg)
ISIS	(Metasystems, Altlußheim)
Metapher	(Metasystems, Altlußheim)
Microsoft Office	(Microsoft corp., Seattle, USA)
Pubmed/Medline	(NIH Software, Bethesda, USA)

3.1.9 Zelllinien

Humane Zelllinien

- A549 humane Lungenkarzinom-Zelllinie, die einem 58-jährigen Patienten entnommen wurde (Giard et al, 1973). Die Zellen wurden in *Dulbecco's Minimal Essential Medium* (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/ Streptomycin und 1 % *Non-essential amino acids* (NEAA) kultiviert und zweimal pro Woche im Verhältnis 1:10 passagiert.
- HSF1 primäre humane Hautfibroblasten eines gesunden Spenders, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. K. Dittman (Eberhard-Karls-Universität Tübingen). Die Zellen wurden in *Minimal Essential Medium* (MEM) mit 10 % fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % *Non-essential amino acids* kultiviert und einmal pro Woche im Verhältnis 1:3 passagiert.
- 180BR primäre humane Hautfibroblasten, die aus einem Leukämie-Patienten isoliert wurden, der durch eine übermäßig starke Reaktion auf eine strahlentherapeutische Behandlung auffällig wurde. Es konnte eine hypomorphe homozygote Mutation (R278) im *LIG4*-Gen nachgewiesen werden, die zu einer fast vollständigen Inaktivierung des Enzyms führte (Riballo et al. 1999, Kühne et al. 2004). Die Zellen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P.A. Jeggo (University of Sussex, Brighton, UK), die Kultivierung erfolgte in *Minimal Essential Medium* (MEM) mit 20 % fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % *Non-essential amino acids*. Die Zellen wurden einmal pro Woche im Verhältnis 1:2 oder 1:3 passagiert.
- AT1BR primäre humane Hautfibroblasten mit einer homozygoten Mutation im *ATM*-Gen (751insSQX + D1853N, Sasaki et al., 1998), isoliert aus einem Patienten mit *Ataxia telangiectasia* (AT). Die Zellen wurden bezogen von der European Collection of animal Cell Cultures (ECACC-Nr. BM0020) und in Ham's

	F10-Medium mit 15 % fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % <i>Non-essential amino acids</i> kultiviert. Das Passagieren erfolgte einmal wöchentlich im Verhältnis 1:3.
CJ179	primäre humane Hautfibroblasten mit einem Defekt im <i>Artemis</i> -Gen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P.A. Jeggo (University of Sussex, Brighton, UK). Die Zellen wurden in <i>Minimal Essential Medium</i> mit 20 % fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % <i>Non-essential amino acids</i> kultiviert und einmal wöchentlich im Verhältnis 1:3 passagiert.
HSC62	primäre humane Hautfibroblasten mit einer hypomorphen Mutation (IVS19-1, G to A) im <i>BRCA2</i> -Gen (Howlett et al., 2002), isoliert aus einem Brustkrebs-Patienten. Die Zellen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Martin Digweed (Humboldt-Universität, Berlin). Die Kultivierung erfolgte in <i>Minimal Essential Medium</i> mit 20 % fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % <i>Non-essential amino acids</i> und die Zellen wurden einmal pro Woche im Verhältnis 1:2 oder 1:3 passagiert.
F02-98 hTert	primäre humane Hautfibroblasten eines Spenders mit Seckel-Syndrom, welche durch Transfektion mit einem retroviralen, hTert-exprimierenden (<i>human telomerase reverse transcriptase</i>) Vectors immortalisiert wurden. Die Expression der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase wirkt der fortschreitenden Verkürzung der Telomer-Enden während der Replikation entgegen und unterbindet somit die replikative Seneszenz. Die Zellen wurden einem Patienten mit Seckel-Syndrom entnommen und weisen eine Punktmutation im <i>ATR</i> -Gen auf, welche zur überwiegenden Expression einer falschen und nicht funktionalen Spleiß-Variante führt. Durch die schwache Expression des normalen Spleiß-Produkts besitzen die Zellen aber noch eine Rest-Aktivität von ATR (Goodship et al. 2000, O'Driscoll et al. 2003). Die Zellen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P.A. Jeggo (University of Sussex, Brighton, UK) und in <i>Minimal Essential Medium</i> mit 20 % fötalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Einmal pro Woche wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 passagiert.

Hamster-Zelllinien

AA8	Wildtyp-CHO-Zelllinie, parentale Linie zu 51D1 und irs1SF. Die Zellen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P.A. Jeggo (University of Sussex, Brighton, UK), die Kultivierung erfolgte in <i>Minimal Essential Medium</i> mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage im Verhältnis 1:10 bis 1:30 passagiert.
-----	---

51D1	CHO-Zelllinien mit einer biallelischen Mutation im <i>Rad51D</i> -Gen (Deletion von Exon 4, Aminosäuren 88-115). Hierbei handelt es sich um die erste isogene Mutante in der DSB-Reparatur im CHO-System (Hinz et al. 2006). Sie wurde im Labor von Dr. L.H. Thompson (Colorado State University, Fort Collins, USA) hergestellt (parentale Zelllinie: AA8), der sie uns freundlicher Weise zur Verfügung stellte. Die Zellen wurden in <i>Minimal Essential Medium</i> mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert und zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:5 bis 1:10 passagiert.
irs1SF	CHO-Zelllinie mit einer Mutation im <i>XRCC3</i> -Gen, die parentale Zelllinie sind AA8-Zellen (Fuller + Painter 1988). Die Zellen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. L.H. Thompson (Colorado State University, Fort Collins, USA), die Kultivierung erfolgte in <i>Minimal Essential Medium</i> mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 bis 1:10 passagiert.
CHO-9	Wildtyp-CHO-Zelllinie, parentale Linie zu EM-C11, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. B. Kaina (Johannes-Gutenberg-Universität Mainz). Die Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert und zweimal pro Woche im Verhältnis 1:20 bis 1:30 passagiert.
EM-C11	CHO-Zelllinie mit einer Mutation im <i>XRCC1</i> -Gen, die parentale Zelllinie sind CHO-9-Zellen (Zdzienicka et al. 1992). Die Zellen wurden von Prof. Dr. B. Kaina (Johannes-Gutenberg-Universität Mainz) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in RPMI-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 bis 1:30 passagiert.
K1	Wildtyp-CHO-Zelllinie, parentale Linie zu XRS-6, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. R. Greinert (Elbe-Klinikum, Buxtehude). Die Zellen wurden in <i>Minimal Essential Medium</i> mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert und zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:20 bis 1:30 passagiert.
XRS-6	CHO-Zelllinie mit einer Mutation im <i>Ku80</i> -Gen, die parentale Zelllinie ist CHO-K1. (Getts + Stamato 1994, Taccioli et al. 1994). Die Zellen wurden von Dr. P.A. Jeggo (University of Sussex, Brighton, UK) freundlicherweise zur Verfügung gestellt und in <i>Minimal Essential Medium</i> mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen im Verhältnis 1:20 bis 1:30 passagiert.



V3-WT	CHO-Zelllinie mit einer Mutation im <i>DNA-PKcs</i> -Gen (parentale Zelllinie: AA8), die mit dem humanen <i>DNA-PKcs</i> -Gen komplementiert wurden (Kurimasa et al. 1999). Die Zellen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. D. Chen (University of Texas, Dallas, USA), die Kultivierung erfolgte in <i>Minimal Essential Medium</i> mit 10 % fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,1 % G418 (200 mg/ml). Zweimal pro Woche wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 bis 1:20 passagiert.
V3	CHO-Zelllinie mit einer Mutation im <i>DNA-PKcs</i> -Gen (parentale Zelllinie: AA8), transfiziert mit einem leeren Vektor (Kurimasa et al. 1999). Die Zellen wurden von Dr. D. Chen (University of Texas, Dallas, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt und in <i>Minimal Essential Medium</i> mit 10 % fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,1 % G418 (200 mg/ml) kultiviert. Das Passagieren erfolgte zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:5 bis 1:10.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

3.2.1.1 Kultivieren und Passagieren

Die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien wurden als Monolayer-Kulturen in 25 cm²- oder 75 cm²-Zellkulturflaschen in einer wasserdampfgesättigten Umgebung mit einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Je nach Zelllinie wurden die Zellen ein- bis dreimal wöchentlich in unterschiedlichen Splittraten passagiert. Dazu wurden das Medium von den Zellen abgenommen und noch vorhandene Mediumsreste durch ein einmaliges Spülen mit sterilem 1xPBS entfernt. Um die adhären Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen zu lösen, wurden die Zellen anschließend mit 1 – 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und für 5 – 10 min bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem, vorgewärmtem Medium aufgenommen und in entsprechendem Splittverhältnis auf neue Zellkulturflaschen mit sterilem Medium aufgeteilt.

3.2.1.2 Aussäen von Zellen

Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden Zellen auf Deckgläsern (mit einem Durchmesser von 12 mm) herangezogen. Hierzu wurden Zellkulturschalen (21,5 cm² oder 8,8 cm²) mit bis

zu 12 sterilen Deckgläsern ausgelegt und diese mit 5 ml Medium überschichtet. Die Zellen wurden wie beim Passagieren aus den Kulturflaschen gelöst und in frischem Medium aufgenommen. Nachdem die Zellzahl dieser Suspension mit Hilfe eines Hämocytometers bestimmt wurde (siehe 2.2.1.3), wurden definierte Volumina Zellsuspension mit definierten Zellzahlen zu den Deckgläsern hinzugegeben. Bei den verwendeten humanen Zelllinien wurden mit Ausnahme von A549-Zellen stets $1,8 \times 10^5$ Zellen, bei den verwendeten CHO-Linien stets $2,7 \times 10^5$ Zellen pro $21,5 \text{ cm}^2$ -Zellkulturschale ausgesät. Für A549-Zellen wurde die Zahl an ausgesäten Zellen je nach Wachstum der Zellkultur von $0,5 \times 10^6$ bis $1,0 \times 10^6$ variiert. Die Aussaat der Zellen erfolgte immer 2 Tage vor der Versuchsdurchführung. Bei den Ansätzen für eine Transfektion mit siRNA wurde von diesen Parametern teilweise abgewichen und der Versuch erst nach 3 Tagen Wachstum durchgeführt (siehe 3.2.1.5).

3.2.1.3 Zellzahlbestimmung mittels Hämocytometer

Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden Zellen auf Deckgläsern (mit einem Durchmesser von 12 mm) herangezogen. Hierzu wurden Zellkulturschalen ($21,5 \text{ cm}^2$ oder $8,8 \text{ cm}^2$) mit bis zu 12 sterilen Deckgläsern ausgelegt und diese mit 5 ml Medium überschichtet. Die Zellen wurden wie beim Passagieren aus den Kulturflaschen gelöst und in frischem Medium aufgenommen. Nachdem die Zellzahl dieser Suspension mit Hilfe eines Hämocytometers bestimmt wurde (siehe 2.2.1.3), wurden definierte Volumina Zellsuspension mit definierten Zellzahlen zu den Deckgläsern hinzugegeben. Bei den verwendeten humanen Zelllinien wurden mit Ausnahme von A549-Zellen stets $1,8 \times 10^5$ Zellen, bei den verwendeten CHO-Linien stets $2,7 \times 10^5$ Zellen pro $21,5 \text{ cm}^2$ -Zellkulturschale ausgesät. Für A549-Zellen wurde die Zahl an ausgesäten Zellen je nach Wachstum der Zellkultur von $0,5 \times 10^6$ bis $1,0 \times 10^6$ variiert. Die Aussaat der Zellen erfolgte immer 2 Tage vor der Versuchsdurchführung. Bei den Ansätzen für eine Transfektion mit siRNA wurde von diesen Parametern teilweise abgewichen und der Versuch erst nach 3 Tagen Wachstum durchgeführt. (siehe 3.2.1.5).

3.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Für eine langfristige Lagerung von Zellen können diese in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt werden. Für diese Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst durch Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung aus den Zellkulturflaschen gelöst und in Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellzahl der erhaltenen Zellsuspension wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen wurden für 10 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 0,9 ml Medium pro einzufrierendem Aliquot resuspendiert, wobei eine Zelldichte zwischen 1×10^6 und 2×10^6 Zellen pro Kryoröhrchen eingestellt

wurde. Die Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen an gekühltem Einfriermedium versetzt und anschließend auf die Kryoröhrchen (je 1,8 ml) verteilt. Mit Hilfe einer speziellen Einfrierbox wurden die Kryoröhrchen langsam auf -80 °C heruntergekühlt und nach 1 - 2 Tagen für die langfristige Lagerung in Tanks mit flüssigem Stickstoff umgesetzt.

Zum Auftauen der kryokonservierten Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und für 3 min bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit 5 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium überführt und anschließend für 10 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Anschließend wurden die Zellen unter den beschriebenen Zellkulturbedingungen kultiviert. 1 – 2 Tage nach dem Auftauen wurden die Zellen bei ausreichender Konfluenz passagiert und dabei gegebenenfalls für die weitere Kultivierung in 75 cm²-Zellkulturflaschen überführt.

3.2.1.5 transiente Transfektion von Zellen mit siRNA

Alle Versuche dieser Arbeit, in denen Reparaturfaktoren mittels siRNA depletiert wurden, wurden in A549-Zellen durchgeführt. Um eine möglichst effektive Depletion der einzelnen Proteine zu erreichen, wurden die verschiedenen siRNAs in unterschiedlichen Endkonzentrationen eingesetzt. Zudem wurden unterschiedlich lange Inkubationszeiten bis zur weiteren Versuchsdurchführung gewählt (siehe Tab.3.2).

Tab.3.2: verwendete Endkonzentrationen und Inkubationszeiten der eingesetzten siRNAs

siRNA	Endkonzentration	Inkubationszeit
Control	10 – 20 nM	48 – 72 h
53BP1	20 nM	72 h
BRCA2	25 nM	48 h
DNA-PKcs	15 nM	48 h
Ku80	20 nM	48 h
MDC1	10 nM	72 h
Rad51	10 nM	48 h

Die transiente Transfektion der Zellen mit siRNA erfolgte mit Hilfe des „HiPerFect Transfection Reagent“. Hierzu wurden A549-Zellen zunächst in definierter Zellzahl auf Deckgläsern in 8,8 cm²-Zellkulturschalen ausgesät (siehe 2.2.1.2) und bis zur Transfektion bei 37 °C inkubiert. Die für die unterschiedlichen Inkubationszeiten verwendeten Zellzahlen sowie die eingesetzten Mengen an Chemikalien sind in Tab.3.3 dargestellt.



Abhängig von der eingesetzten Konzentration wurde nun eine definierte Menge an siRNA in einem definierten Volumen Zellkulturmedium ohne Zusätze gelöst und eine entsprechende Menge an HiPerFect-Reagenz hinzugegeben (siehe Tab.3.3). Damit sich in den Proben die Transfektionskomplexe ausbilden konnten, wurden die Proben für 1 min gevortext und anschließend für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Transfektionsreagenz tropfenweise und unter Schwenken zu den ausgesäten Zellen gegeben. Bis zu dem Zeitpunkt, an dem die gewünschte Depletion erreicht sein sollte, wurden die Zellen bei den regulären Bedingungen kultiviert.

Tab.3.3: Für die Transfektion von A549 eingesetzte Zellzahlen und Mengen an Medium, siRNA, Medium ohne alles und HiPerFect-Reagenz für Versuchsansätze über 48 h und 72 h

Zeit	Zellzahl	Medium	siRNA	Medium ohne alles	HiPerFect
48 h	$0,5 \times 10^5$	2,2 ml	1,2 – 3 µl	ad. 100 µl	12 µl
72h	$0,3 \times 10^5$				

3.2.2 Induktion von DNA-Schäden

3.2.2.1 Röntgenbestrahlung von Zellen

Die Bestrahlung von Zellen mit Röntgenstrahlung erfolgte mit den Röntgenröhren Isovolt Titan E (GE) oder MCN 165/796704 (Philips) mit einer Wolfram-Anode und einem Beryllium-Austrittsfenster. Bei allen Bestrahlungen wurden eine Beschleunigungsspannung von 90 kV und eine Stromstärke von 19 mA angelegt. Die Bestrahlung erfolgte auf definierten Höhen zentral über dem Austrittsfenster bei einer Filterung durch 2 mm Aluminium. Für diese Bedingungen wurde mit Hilfe der Fricke-Dosimetrie und einem PTW-Weichstrahlkammer-Dosimeter die erzielte Dosisleistung bestimmt und regelmäßig kontrolliert. Die Dosisleistungen für die verschiedenen Bedingungen sind in Tab.3.4 aufgeführt.

Bei der Bestrahlung von auf Deckgläsern wachsenden Zellen musste ein zusätzlicher Gewichtungsfaktor berücksichtigt werden. Aufgrund der höheren optischen Dichte von Glas im Vergleich zu Kunststoff entstehen bei einer Röntgenbestrahlung auf Glas zusätzliche Sekundärelektronen. Diese können die adhären Zellen erreichen und zusätzlich schädigen, werden aber weder durch ein Dosimeter noch mittels Fricke-Dosimetrie detektiert. Untersuchungen mittels γ H2AX-Immunfluoreszenz ergaben, dass die effektiv verabreichte Strahlendosis auf Deckgläsern etwas doppelt so hoch ist wie auf Kunststoffflächen wie z. B. Zellkulturflaschen (Kegel et al. 2007). Daher wurden die in dieser Arbeit applizierten Strahlendosen auf Deckgläsern mit dem Faktor 2 verrechnet.

Tab.3.4: Dosisleistungen der Röntgenröhren Isovolt Titan E und MCN 165/796704 auf definierten Höhen über dem Austrittsfenster der Röhre bei einer Beschleunigungsspannung von 90 kV und einer Stromstärke von 19 mA

Röntgenröhre	Höhe über Austrittsfenster	Dosisleistung
Isovolt Titan E	16 cm	2,98 Gy/min
	25 cm	1,52 Gy/min
MCN 165/796704	13 cm	2,04 Gy/min

3.2.2.2 Behandlung von Zellen mit MMS

Die Behandlung von Zellen mit MMS erfolgte immer 2 Tage nach der Aussaat der Zellen, lediglich bei manchen siRNA-Ansätzen wurden die Zellen erst 3 Tage nach der Aussaat behandelt. Für die MMS-Behandlung wurde zunächst eine frische 100 mM MMS-Stamm-lösung in MilliQ angesetzt. Diese wurde dann mit Zellkulturmedium auf die gewünschte Endkonzentration (0,1 mM – 2,5 mM) verdünnt. Das Medium auf den Zellen wurde abgenommen, durch das MMS-haltige Medium ersetzt und die Zellen damit für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden das MMS-haltige Medium wieder entfernt und die Zellen einmal kurz mit 1xPBS gespült. Frisches Medium wurde den Zellen zugegeben und diese wurden bis zu Fixierung weiter bei 37 °C inkubiert.

In den meisten Versuchen dieser Arbeit wurde die einstündige MMS-Behandlung mit einer BrdU- oder EdU-Pulsmarkierung kombiniert. Dazu wurden dem Reaktionsansatz zusätzlich 10 µl/ml BrdU bzw. 1µl/ml EdU zugegeben.

3.2.2.3 Behandlung von Zellen mit spezifischen Kinase-Inhibitoren

In einem Teil der Versuche der vorliegenden Arbeit wurden zur Inhibition der Kinasen ATM und DNA-PK spezifische Kinase-Inhibitoren eingesetzt. Der verwendete ATM-Inhibitor wirkt dabei selektiv als ATP-kompetitiver Inhibitor der ATM-Kinase, während der DNA-PK-Inhibitor spezifisch die katalytische Untereinheit der DNA-PK hemmt. Die Inhibitoren wurden den Proben in der Regel 1 h vor der Schadens-Induktion in den Konzentrationen 10 µM (ATMi) bzw. 20 µM (DNA-PKi) zugegeben. Die Behandlung wurde bis zur Fixierung der Proben aufrechterhalten. Fanden Mediumswechsel (z. B. nach der MMS-Behandlung) statt, wurden die Inhibitoren dem frischen Medium ebenfalls wieder zugegeben.

3.2.3 Zellzyklusspezifische Immunfluoreszenz-Analysen

In der vorliegenden Arbeit wurde das Reparaturverhalten von Zellen nach DNA-Schädigung hauptsächlich mit Hilfe der γ H2AX-Immunfluoreszenztechnik untersucht. Dabei wird die Schadens-abhängige Phosphorylierung des Histons H2AX mit Hilfe von spezifischen Primärantikörpern und Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpern im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Auch anderen Reparaturfaktoren, welche sich um einen DSB anlagern (z. B. Rad51 oder 53BP1), können durch diese Methode detektiert werden.

3.2.3.1 BrdU- und EdU-Markierung replizierender Zellen

Da das Reparaturverhalten der Zellen in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase untersucht werden sollte, war eine sichere Zuordnung der Zellen im Zellzyklus in der Immunfluoreszenz entscheidend. Dafür wurden die Zellen vor der Induktion der DNA-Schäden mit den Thymidin-Analoga BrdU (5-Bromo-2'-desoxy-Uridin) oder EdU (5-Ethynyl-2'-desoxy-Uridin) behandelt. Während der Replikation werden diese Nukleotid-Analoga anstellen von Thymidin in die DNA eingebaut und können danach mittels spezifischer Antikörper oder spezieller Färbetechniken sichtbar gemacht werden. Dadurch wird eine sichere Identifizierung von S-Phase-Zellen in der Immunfluoreszenz möglich.

Für die Markierung von Zellen in der S-Phase wurden dem Zellkulturmedium 10 μ M BrdU bzw. 10 μ M EdU zugegeben und die Proben 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Markierung wurde das Medium abgenommen, die Zellen 1 – 2 x kurz mit 1xPBS gewaschen und frisches Medium zugegeben. Bei den Experimenten nach Röntgenbestrahlung erfolgte die 1-stündige BrdU- bzw. EdU-Markierung direkt vor der Bestrahlung, bei den Untersuchungen MMS-induzierter Schäden wurde die BrdU/EdU-Markierung mit der MMS-Behandlung kombiniert.

3.2.3.2 Fixierung von Zellen auf Deckgläsern.

Abhängig von den verwendeten Antikörpern wurden zwei unterschiedliche Arten der Fixierung angewandt: die Methanol/Aceton- und die Formaldehyd-Fixierung. Die Zellen für γ H2AX- und BrdU-Färbungen wurden meist nach dem Methanol/Aceton-Protokoll fixiert, eine Fixierung mittels Formaldehyd war hier aber ebenfalls möglich. Im Gegensatz dazu wurden für Rad51-Färbungen nur nach der Formaldehyd-Fixierung gute Ergebnisse erzielt, so dass hier stets diese Variante der Fixierung angewandt wurde.

Methanol/Aceton-Fixierung

Nach Entfernen des Mediums wurden die mit Zellen bewachsenen Deckgläser mit eiskaltem Methanol überschichtet und für 30 min bei -20 °C inkubiert und anschließend für 1 min im eiskalten Aceton-Bad permeabilisiert. Danach wurden die Proben 3 x 10 min mit

1xPBS/1%FCS bei RT gewaschen und bis zur Immunfluoreszenz-Färbung in 1xPBS/1%FCS + 5% BSA bei 4 °C gelagert.

Formaldehyd-Fixierung

Die mit Zellen bewachsenen Deckgläsern wurden, nachdem das Medium entfernt worden war, mit einer 2%-igen Formaldehydlösung (in 1xPBS) überschichtet und 15 min bei RT inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit 1xPBS (10 min bei RT) wurden die Zellen mit 0,2 % Triton X-100 (in 1xPBS/1%FCS) für 5 min bei 4 °C permeabilisiert und anschließend 2 x 10 min mit 1xPBS/1%FCS bei RT gewaschen. Bis zur Immunfluoreszenz-Färbung wurden die Proben in 1xPBS/1%FCS + 5% BSA bei 4 °C gelagert.

3.2.3.3 γ H2AX/BrdU-Doppelfärbung

Die fixierten Deckgläser wurden in einer feuchten Kammer ausgelegt und mit 40 μ l Primärantikörperlösung (rabbit anti- γ H2AX, 1:1000 in 1xPBS/1%FCS + 5% BSA) überschichtet und für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser 2 x 10 min in 1xPBS/1%FCS und 1 x 10 min in 1xPBS gewaschen. Um die γ H2AX-Färbung mit der BrdU-Färbung kombinieren zu können, wurde ein *Crosslinking*-Schritt durchgeführt, indem die Deckgläser 20 min in 2,5 % Formaldehyd in 1xPBS bei RT inkubiert wurden. Danach wurden die Deckgläser 1 x 10 min in 1xPBS und 2 x 10 min in 1xPBS/1%FCS gewaschen. Für die BrdU-Färbung wurden die Deckgläser nun in der feuchten Kammer mit je 30 μ l BrdU-Primärantikörperlösung (aus dem 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit, 1:180 im Inkubationspuffer aus diesem Kit), zu welcher zusätzlich 1 μ l/ml DNase gegeben wurde, überschichtet und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Deckgläser wurden nun 3 x 10 min in 1xPBS/1%FCS gewaschen und anschließend mit je 40 μ l Sekundärantikörperlösung (goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 und goat anti-mouse Alexa Fluor 594, 1:500 in 1xPBS/1%FCS + 5% BSA) für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach 4 Waschschritten mit 1xPBS (je 15 min bei RT) erfolgte die DAPI-Färbung der Zellen. Dazu wurden die Deckgläser für 3 min in 1xPBS + 0,2 μ g/ml DAPI bei RT inkubiert und anschließend für 5 min in 1xPBS gewaschen. Danach wurden die Deckgläser mit je 3 μ l Mounting Medium auf Objektträger gelegt und die Ränder mit Nagellack versiegelt. Bis zur Auswertung der Proben im Fluoreszenzmikroskop wurden sie bei 4 °C gelagert.

3.2.3.4 γ H2AX/EdU-Doppelfärbung

Die Markierung von replizierenden Zellen mit EdU hat große Vorteile gegenüber einer BrdU-Markierung. Während das in die DNA inkorporierte BrdU mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen wird (siehe 3.2.3.3), erfolgt die Detektion von EdU durch eine

sogenannte Click-Reaktion (Wang et al. 2003). Dabei wird ein Azid (in diesem Fall der Fluoreszenzfarbstoff) in einer Kupfer-katalysierten Reaktion kovalent an ein Alkin (hier: das eingebaute EdU) gebunden. Diese Methode hat zum einen den Vorteil, dass im Gegensatz zur Färbung von BrdU keine Antikörper zum Einsatz kommen. So ergibt sich durch die EdU-Färbung keine Einschränkung für die Wahl an Antikörpern für die weiteren Immunfärbungen. Desweiteren muss die DNA für eine BrdU-Färbung denaturiert werden, damit der BrdU-Antikörper an sein Epitop binden kann. Diese Denaturierung, die der Detektion von γ H2AX- und weiteren Foci entgegenwirkt, wird durch den Einsatz der EdU-Click-IT-Technik vermieden.

Für eine kombinierte γ H2AX/EdU-Färbung wurden die fixierten Deckgläser zunächst in einer feuchten Kammer mit 40 μ l Primärantikörperlösung (mouse anti- γ H2AX, 1:2000 in 1xPBS/1%FCS + 5% BSA) überschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit 1xPBS/1%FCS + 0,1% Tween (je 10 min bei RT) erfolgte die Click-IT-Färbung gegen EdU. Dazu wurde den Anleitungen des Färbe-Kits folgend der Click-IT-Reaktions-Cocktail (430 μ l 1xClick-IT reaction buffer, 50 μ l reaction buffer additive (1:10 in MilliQ), 20 μ l CuSO₄ und 1,2 μ l Alexa Fluor® azide) angesetzt und die Proben damit für 30 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Deckgläser in 1xPBS + 3% BSA für 10 min gewaschen und für 30 min bei RT geblockt. Anschließend wurden die Deckgläser in der feuchten Kammer mit je 40 μ l Sekundärantikörperlösung (goat anti-mouse Alexa Fluor 488, 1:500 in 1xPBS/1%FCS + 5% BSA) für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Deckgläser 4 x 15 min in 1xPBS + 0,1% Tween gewaschen und für 3 min in 1xPBS + 0,2 μ g/ml DAPI inkubiert. Nach einem 5-minütigen Waschschriff in 1xPBS + 0,1% Tween wurden die Deckgläser mit je 3 μ l Mounting Medium auf Objektträger gelegt, mit Nagellack versiegelt und bis zur mikroskopischen Auswertung bei 4 °C gelagert.

Die Qualität der EdU- und der γ H2AX-Färbung bleibt unverändert, wenn die Click-Reaktion vor der Inkubation mit primärem Antikörper erfolgt. So wurde in einem Teil der durchgeführten Versuche von dem zuvor beschriebenen Protokoll abgewichen und mit der Click-IT-Färbung gegen EdU begonnen. Die Inkubationsschritte mit primären und sekundären Antikörpern gegen γ H2AX wurden anschließend durchgeführt.

3.2.3.5 Immunfluoreszenz-Färbungen gegen Rad51 und 53BP1

Neben den γ H2AX-Färbungen wurden in dieser Arbeit auch Färbungen gegen die Reparaturfaktoren Rad51 und 53BP1 durchgeführt. Diese Färbungen wurden ebenfalls mit einer EdU-Färbung kombiniert, das Färbeprotokoll wurde weitgehend analog zur γ H2AX-Färbung durchgeführt (siehe 3.2.3.3). Bei einer Färbung gegen Rad51 erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern (rabbit anti-Rad51) stets über Nacht bei 4 °C, wobei der Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt wurde. Für eine Färbung von 53BP1 wurden die

Primärantikörper (mouse anti-53BP1 oder rabbit anti-53BP1) in einer 1:2000-Verdünnung eingesetzt und die Inkubation erfolgte ebenfalls über Nacht bei 4 °C.

Die Färbungen gegen γ H2AX, Rad51 und 53BP1 wurden auch miteinander kombiniert. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Primärantikörper aus gleichen Spezies zusammen eingesetzt wurden. Deshalb wurde die Spezies des primären 53BP1-Antikörpers an die Spezies des zweiten Primärantikörpers angepasst. Bei diesen Färbansätzen gegen zwei Reparaturfaktoren wurde stets ein EdU-Färb-Kit mit einem Cy5-Farbstoff verwendet. Dieser emittiert Licht im sehr langwelligen Bereich von rotem Licht, welches für das menschliche Auge kaum sichtbar ist, von der Kamera des Fluoreszenzmikroskops aber detektiert werden kann. Dadurch konnten die für das Auge deutlich besser erkennbaren grünen und roten Farbstoffe für die Detektion der Reparaturfaktoren verwendet werden.

3.2.3.6 γ H2AX/pH3-Doppelfärbung

Zur Untersuchung von γ H2AX-Foci in mitotischen Zellen erfolgte die γ H2AX-Färbung analog zu dem unter 3.2.3.4 beschriebenen Protokoll und wurde teilweise auch mit einer EdU-Färbung (mit Cy5-Farbstoff) kombiniert. Zur sicheren Identifizierung von mitotischen Zellen wurde zusätzlich die phosphorylierte Form von Histon H3 (pH3) angefärbt. Dazu wurden der γ H2AX-Primärantikörperlösung auch primäre Antikörper gegen pH3 (rabbit anti-pH3, 1:1000) zugegeben. Die sekundären Antikörper für die pH3-Färbung (goat anti-rabbit Alexa Fluor 594) wurden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

3.2.3.7 Auswertung der Foci-Färbungen

Die Auswertung der γ H2AX-, Rad51- oder 53BP1-Foci erfolgte im Fluoreszenzmikroskop bei 1000facher Vergrößerung. Dabei wurde für jeden untersuchten Datenpunkt die Anzahl an Foci in mindestens 40 Zellen bestimmt und der Mittelwert zwischen diesen Werten errechnet. Unter Bedingungen, bei denen weniger als 1 Focus pro Zelle auftrat, wurde die Anzahl an ausgewerteten Zellen soweit erhöht, bis 40 Foci detektiert wurden. Die Experimente wurden in der Regel mindestens 3 Mal durchgeführt. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse stellen die Mittelwerte aus den unabhängigen Experimenten dar, die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler zwischen diesen Mittelwerten.

3.2.3.8 Identifizierung von Zellzyklusphasen in der Immunfluoreszenz

Die Zellen, die sich zur Zeit der Schadensinduktion in der S-Phase des Zellzyklus befunden hatten, konnten anhand des BrdU- oder EdU-Signals identifiziert werden. Darüber hinaus konnte anhand des DAPI-Signals, welches sich proportional zum DNA-Gehalt der Zellen

verhält, auch zwischen Zellen in der G1- und der G2-Phase unterschieden werden. G2-Zellen haben einen doppelten DNA-Gehalt und somit ein doppelt so starkes DAPI-Signal wie G1-Zellen, das DAPI-Signal von Zellen in der S-Phase liegt dazwischen. Mit Hilfe der Software Metapher (Metasystems) können sowohl das DAPI-Signal als auch die BrdU- bzw. EDU-Intensität gemessen werden. Gegeneinander aufgetragen ergibt sich eine typische Verteilung der Zellen, anhand derer man zwischen G1-, S- und G2-Zellen unterscheiden kann (siehe Abb.4.1). Mit Hilfe einer Relokierungsfunktion der Software war es nun möglich spezifisch für die zu untersuchenden Zellzyklusphasen Zellen auf dem Objektträger wiederzufinden und auf ihr Reparaturverhalten hin zu untersuchen.

Bei Versuchsansätzen, in denen das Reparaturverhalten spezifisch für G2-Zellen untersucht werden sollte, wurden die Zellen nach der 1-stündigen EdU-Markierung bis zur Fixierung in Gegenwart des Polymerase-Inhibitors Aphidicolin (3 µg/ml) kultiviert. Durch die Hemmung replizierender Polymerasen werden Zellen in der S-Phase arretiert. Dadurch wird verhindert, dass Zellen, die in der S-Phase geschädigt wurden, bei längeren Reparaturzeiten in die G2-Phase progressieren und die Ergebnisse verfälschen. Zusätzlich wurde den Zellen 100 ng/ml Nocodazol zugegeben, wodurch Zellen, die in die Mitose übergehen, in dieser Phase arretiert werden.

Bei der Analyse von γH2AX-Foci in mitotischen Zellen wurden die Zellen in einem Teil der Ansätze mit dem PIKK-Inhibitor Koffein behandelt um den G2/M-Checkpoint aufzuheben und Zellen in der Mitose anzureichern. Hierzu wurde den Proben 3 h vor der Fixierung 2 mM Koffein zugegeben.

3.2.4 Durchflusszytometrische Methoden

Neben dem Reparaturverhalten von Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit auch das Zellzyklusverhalten nach DNA-Schädigung mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACS) untersucht. Für eine zweidimensionale FACS-Analyse wurden die Zellen für 2 Tage in Zellkulturflaschen kultiviert und dann für 1 h mit 10 µM BrdU markiert. Eine MMS-Behandlung der Zellen wurde mit dieser BrdU-Markierung kombiniert.

3.2.4.1 Ernten von Zellen für FACS-Analysen

Zum Ernten der BrdU-markierten Zellen wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen 1 Mal mit 1xPBS (10-20 ml) gewaschen. Anschließend wurden sie mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurde in 5 ml Medium resuspendiert und in Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation (10 min, 400 g, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml

1xPBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Nach einem zweiten Zentrifugations-schritt wurde der Überstand erneut abgenommen und das Pellet durch tropfenweise Zugabe von 2 ml eiskaltem 70% Ethanol unter ständigem Vortexen fixiert. Bis zu den weiteren Versuchsschritten wurden die Proben bei -20°C gelagert.

3.2.4.2 BrdU/PI-Färbung

Die Färbung der Proben für eine FACS-Analyse erfolgte gegen BrdU und den DNA-interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid. Dafür wurden die fixierten Zellen zunächst zentrifugiert (10 min, 400 g, 4°C), die Pellets in je 2 ml 1xPBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Zur Denaturierung der DNA wurden die Pellets in 500 μl 2 M HCl in 1xPBS resuspendiert und 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von je 1 ml 1xPBS/1%FCS wurden die Proben erneut zentrifugiert. Zur Neutralisation wurden die Zellpellets nun in je 500 μl 0,1 M Natriumtetraborat (pH 8,5) gelöst und für 2 min bei RT inkubiert. Danach wurde je 1 ml 1xPBS/1%FCS zugegeben und die Proben erneut zentrifugiert. Danach wurden die Pellets in je 20 μl BrdU-Antikörperlösung (FITC conjugated Mouse anti-BrdU Monoclonal Antibody) resuspendiert und 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach Resuspendieren mit je 1 ml 1xPBS/1%FCS und erneuter Zentrifugation wurden die Pellets in je 500 μl Propidiumiodid-Lösung (10 % PI-Stocklösung, 85 % 1xPBS und 5 % RNase) resuspendiert und 30 min bei RT (dunkel) inkubiert. Danach wurden sie bis zur FACS-Analyse im Kühlschrank aufbewahrt.

3.2.4.3 Messen der Proben im Durchflusszytometer

Die Messung der Proben wurde an zwei unterschiedlichen Durchflusszytometern durchgeführt, dem Gerät FACS ScanTM (Becton Dickinson) und dem Gerät FC500 (Beckman Coulter).

Die Messung erfolgte bei einer Anregung durch einen Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Das Signal des FITC-gekoppelten BrdU-Antikörpers wurde dabei in einem Wellenlängenbereich von 505 – 545 nm aufgenommen, das Propidiumiodid-Signal zwischen 564 und 606 nm. Am Durchflusszytometer FC500 wurde das FITC-Signal des eingebauten BrdUs in Kanal FL1 mit logarithmischer Aufnahme und das PI-Signal in Kanal FL3 mit linearer Aufnahme gemessen. Pro Probe wurden zwischen 15000 und 20000 Zellen analysiert. Die Auswertung der erhalten Messergebnisse erfolgte mit der Software Cell Quest (bei FACS ScanTM) oder der Software CXP Analysis (bei FC500).

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung einer S-Phase-spezifischen γ H2AX-Immunfluoreszenzanalyse zur Untersuchung MMS-induzierter DNA-Schäden

Alkylierende Substanzen wie Methylmethansulfonat (MMS) werden für die chemotherapeutischen Behandlungen unterschiedlicher Tumore wie z. B. maligne Gliome eingesetzt (Villano et al. 2009). Daher wurden die Grundlagen der DNA-schädigende Wirkung dieser Substanzen in den letzten Jahren intensiv untersucht. Die genauen molekularen Mechanismen der Erzeugung und Reparatur MMS-induzierter DNA-Schäden wurden dabei noch nicht vollständig aufgeklärt, der Homologen Rekombination (HR) wird aber eine entscheidende Rolle bei der Reparatur dieser Schäden zugeschrieben. So konnte in Überlebensstudien gezeigt werden, dass HR-defiziente Zelllinien sehr empfindlich gegenüber einer Behandlung mit MMS reagieren, während Zellen mit einem Defekt in der Nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ) fast keine erhöhte Sensitivität zeigen (Lundin et al. 2005, Hinz et al. 2006). Bei diesen Studien bleibt aber unklar, in welcher Phase des Zellzyklus sich die toxische Wirkung von MMS manifestiert. Diskutiert wird hierbei meist ein Zusammenhang mit der S-Phase. So können zum einen einige der durch MMS methylierten Basen (z. B. N3-Methyl-adenin) die Replikation blocken (Larson et al. 1985, Engelward et al. 1998). Zum anderen scheinen Intermediate, die während der Reparatur dieser methylierten Basen mittels BER entstehen (z. B. SSBs), die Replikation zu stören. Dadurch kommt es zur Ausbildung von arretierten oder kollabierten Replikationsgabeln und somit zur Induktion von Replikations-assoziierten DSBs. Zellen mit einem Defekt in der BER, welcher zur Akkumulation von SSBs führt (z. B. bei einer XRCC3- oder Pol β -Defizienz), reagieren sehr empfindlich auf eine Behandlung mit MMS (Thompson et al. 1982, Sobol et al. 2003). Zudem wurde in diesen Zellen eine erhöhte Zahl an γ H2AX-Foci nach einer MMS-Behandlung detektiert (Pascucci et al. 2005). Diese Beobachtungen bezogen sich aber nur auf die gesamte untersuchte Zellpopulation. Aussagen über die Unterschiede zwischen den einzelnen Zellzyklus-Phasen waren anhand der verwendeten Methoden nicht möglich, so dass nur ein indirekter Zusammenhang mit der Replikation hergestellt werden konnte.

4.1.1 Methodischer Ansatz zu Analyse von γ H2AX-Foci in der S-Phase

In der vorliegenden Arbeit sollte die DNA-schädigende Wirkung von MMS spezifisch für S-Phase-Zellen untersucht werden. Die γ H2AX-Immunfluoreszenz ist eine etablierte Methode zur Untersuchung strahleninduzierter DSBs in der G1- und G2-Phase (Rothkamm + Löbrich 2003, Löbrich et al. 2010). In dieser Arbeit sollte diese Methode auch auf die Analyse von

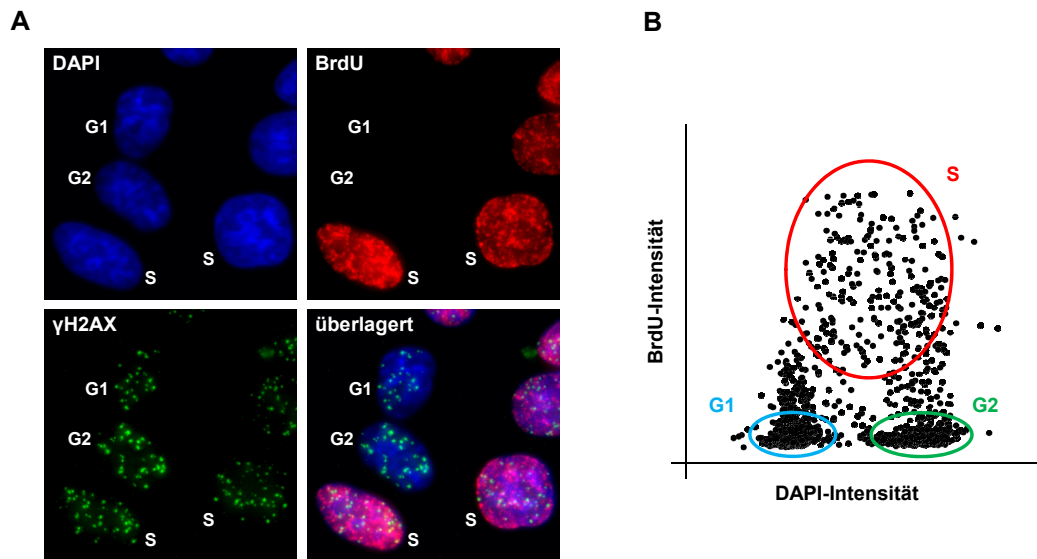


Abb.4.1: Zellzyklus-spezifische γ H2AX-Immunfluoreszenz-Analyse bestrahlter Hamsterzellen

(A) Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen einer γ H2AX/BrdU-Immunfärbung in WT-Hamsterzellen (AA8), 15 min nach einer Bestrahlung mit 1 Gy, aufgenommen bei 1000facher Vergrößerung. Die Zellen wurden für 1 h mit 10 μ M BrdU behandelt und anschließend mit 1 Gy bestrahlt. Nach einer Reparaturzeit von 15 min wurden die Zellen fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen γ H2AX (grün) und BrdU (rot) gefärbt. Die Färbung der DNA erfolgte mittels DAPI (blau). Die Identifizierung der Zellzyklus-Phasen erfolgte mit Hilfe der Software Metapher (Metasystems). Dabei wurden die BrdU- und die DAPI-Intensitäten der Zellen gegeneinander aufgetragen (B). Zellen in der S-Phase wurden anhand des eingebauten BrdUs identifiziert. Bei den BrdU-negativen Zellen konnte anhand des DNA-Gehalts zwischen Zellen in der G1-Phase (einfache DAPI-Intensität) und der G2-Phase (doppelte DAPI-Intensität) unterschieden werden.

MMS-induzierten Schäden in der S-Phase ausgeweitet werden. Dazu wurde ein Färbeansatz etabliert, bei dem eine γ H2AX-Färbung mit einer Markierung von replizierenden Zellen mittels BrdU oder EdU kombiniert wurde. Die Thymidin-Analoga BrdU und EdU werden von den Zellen während der Replikation in die DNA eingebaut und können hier mit spezifischen Antikörpern (bei BrdU) oder kommerziell erhältlichen Färbe-Kits (bei EdU) nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.2.3). Durch eine 1-stündige Behandlung der Zellen mit BrdU oder EdU direkt vor der Schadensinduktion wird es nach einer γ H2AX-Immunfärbung möglich, die induzierten γ H2AX-Foci spezifisch in den BrdU- bzw. EdU-markierten S-Phase-Zellen zu untersuchen. Ein repräsentatives Beispiel für eine kombinierte γ H2AX/BrdU-Immunfluoreszenz ist in Abb.4.1.A dargestellt. Zusammen mit dem Einsatz der Mikroskopie-Software Metapher der Firma Metasystems eröffnet dieser Färbeansatz zusätzlich die Möglichkeit der Analyse von γ H2AX-Foci in der G1- und G2-Phase. Dazu werden die Proben im Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe dieser Software eingescannt, wobei für jede Zelle die BrdU- und die DAPI-Intensität gemessen wird. In einem Dot-Plot gegeneinander aufgetragen ergibt sich so eine charakteristische Hufeisen-förmige Verteilung der Zellpopulation, in der man die einzelnen Zellzyklus-Phasen unterscheiden kann (Abb.4.1.B). Zellen in der S-Phase können anhand des deutlichen BrdU-Signals identifiziert werden, wobei sie einen mittleren DNA-Gehalt

aufweisen. Zellen in der G1- und G2-Phase sind BrdU-negativ und weisen ein sehr schwaches BrdU-Signal auf. Anhand ihres unterschiedlichen DNA-Gehalts (G2-Zellen besitzen einen doppelten DNA-Gehalt im Vergleich zu G1-Zellen) und der damit verbundenen unterschiedlichen DAPI-Intensität können sie zuverlässig voneinander unterschieden werden.

4.1.2 Untersuchung des γ H2AX-Reparaturverhaltens nach Bestrahlung in der S-Phase

γ H2AX-Foci sind ein etablierter Marker strahlen-induzierter DSBs in der G1- und G2-Phase. Die Phosphorylierung von H2AX erfolgt hierbei über die Kinasen ATM und DNA-PK, die spezifisch durch das Auftreten von DSBs aktiviert werden (Segupta + Harris 2005, Lees-Miller et al. 1990). In der S-Phase ist die Situation dagegen komplizierter. Hier können einzelsträngige Bereiche an Replikationsgabeln die Kinase ATR aktivieren, die ebenfalls H2AX phosphorylieren kann (Zou + Elledge 2003). Daher wäre es möglich, dass während der S-Phase neben DSBs weitere Strukturen auftreten (z. B. arretierte Replikationsgabeln), die zur Ausbildung von γ H2AX-Foci führen.

Bevor die γ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung zur Analyse MMS-induzierter DNA-Schäden in der S-Phase eingesetzt wurde, sollte daher zunächst die generelle Anwendbarkeit dieser Methode für S-Phase-Zellen getestet werden. Dazu wurde zunächst überprüft, ob γ H2AX-Foci auch in der S-Phase einen zuverlässigen Marker für strahleninduzierte DSBs darstellen, indem das Induktions- und Reparaturverhalten strahleninduzierter DSBs in der S-Phase mit dem Verhalten von Zellen in der G1- und G2-Phase verglichen wurde, welches in den letzten Jahren intensiv untersucht wurde (Riballo et al. 2004, Beucher et al. 2009).

Hierfür wurden exponentiell wachsende Hamsterzellen für 1 h mit 10 μ M BrdU oder EdU markiert und anschließend mit einer Dosis von 1 Gy bestrahlt. Untersucht wurden hierbei mehrere WT-Zelllinien sowie Zelllinien mit einer HR- oder NHEJ-Defizienz. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten wurden die Zellen fixiert und einer Immunfluoreszenzfärbung gegen γ H2AX und BrdU bzw. EdU unterzogen. Mit Hilfe des Scanning-Ansatzes der Software Metapher wurden im Fluoreszenzmikroskop G1-, S- und G2-Zellen identifiziert und die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci in diesen Populationen wurde bestimmt. Die erhaltenen γ H2AX-Reparaturkinetiken in den untersuchten Zellzyklus-Phasen sind in Abb.4.2 dargestellt.

Mittels der angewandten Methode der kombinierten γ H2AX/BrdU-Immunfluoreszenzfärbung konnte parallel das DSB-Reparaturverhalten von G1-, S- und G2-bestrahlten Zellen untersucht werden. Die zu einem Zeitpunkt von 15 min nach Bestrahlung ermittelten Induktionswerte zeigten dabei einen erwarteten Zusammenhang zum DNA-Gehalt der Zellen. In allen untersuchten Zelllinien wiesen in der G2-Phase bestrahlte Zellen (Abb.4.2.C) einen doppelt so hohen γ H2AX-Induktionswert auf wie G1-bestrahlte Zellen (Abb.4.2.A), welcher mit dem

doppelten DNA-Gehalt von G2-Zellen korreliert. Für Zellen in der S-Phase kann ein intermediärer DNA-Gehalt angenommen werden, da die Replikation in diesen Zellen noch nicht abgeschlossen ist. Konsistent mit dieser Annahme zeigten die in der S-Phase bestrahlten BrdU- bzw. EdU-positiven Zellen eine initiale Anzahl an γ H2AX-Foci, die zwischen den Werten in G1- und G2-Zellen lag (Abb.4.2.B).

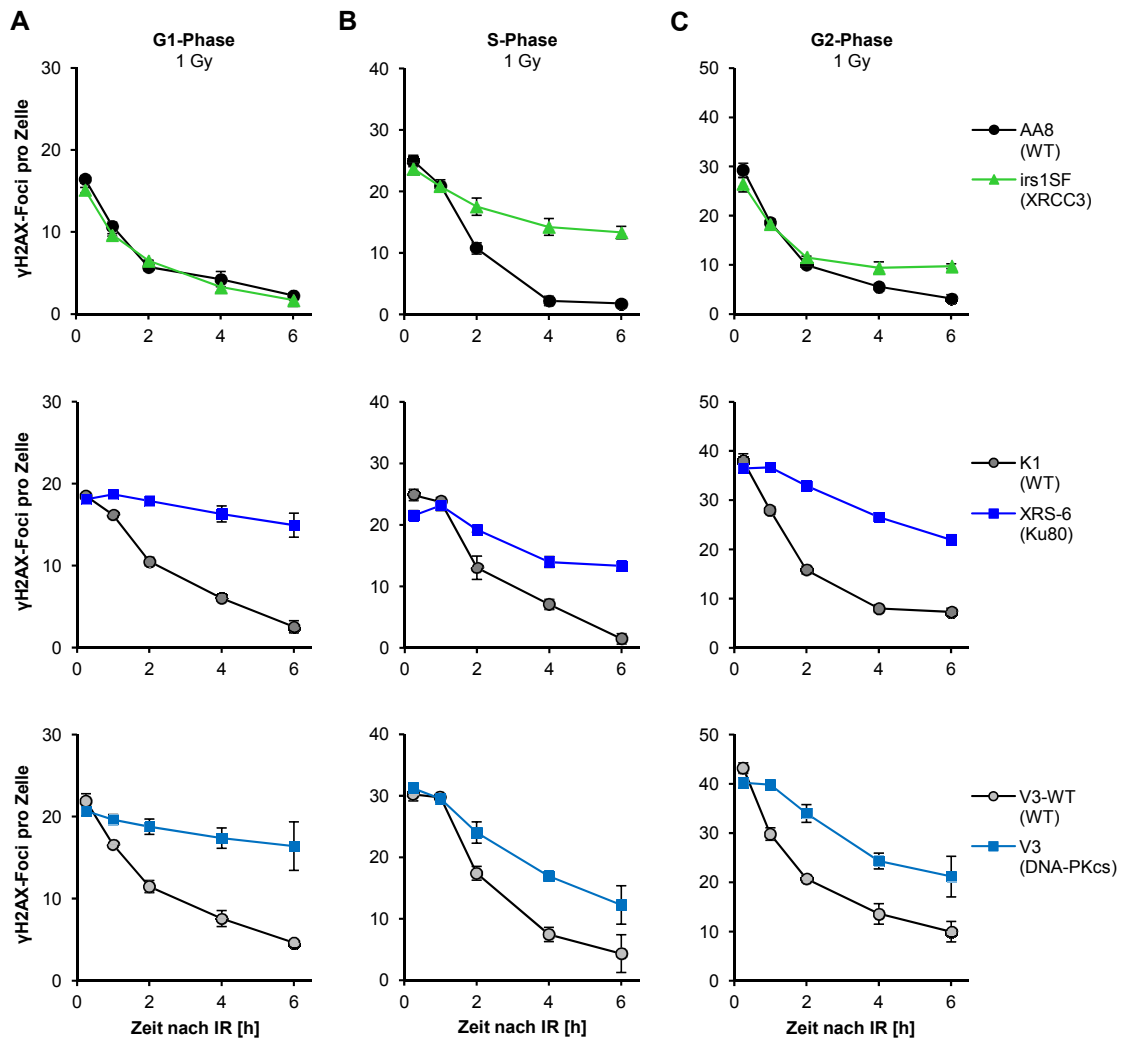


Abb.4.2: γ H2AX-Reparaturverhalten HR- und NHEJ-defizienter CHO-Zellen nach Bestrahlung in der G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklus

Exponentiell wachsende CHO-Zelllinien mit einer Defizienz im Weg der HR (irs1SF) oder des NHEJ (XRS-6 und V3) sowie die korrespondierenden WT-Linien wurden für 1 h mit 10 μ M BrdU bzw. EdU markiert und anschließend mit einer Dosis von 1 Gy bestrahlt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten (15 min – 6 h) wurden die Zellen fixiert und immunfluoreszenztechnisch gegen γ H2AX und BrdU bzw. EdU gefärbt. Pro Zeitpunkt wurde die Anzahl an γ H2AX-Foci in je 40 Zellen in der G1-Phase (A), S-Phase (B) und G2-Phase (C) bestimmt. Um spezifisch die Reparatur strahleninduzierter DSBs zu untersuchen, wurden die hier dargestellten Werte um die Zahl an spontan auftretenden γ H2AX-Foci bereinigt, welche zwischen den einzelnen Zellzyklus-Phase stark variierte (in G1: < 2, in S: 10 – 20, in G2: 2 – 6). Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus 3 – 4 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an.

Durch die Untersuchung unterschiedlicher Reparaturmutanten konnte die Bedeutung der Reparaturwege HR und NHEJ für alle Zellzyklus-Phasen beurteilt werden. Voraussetzung für den Prozess der HR ist das Vorhandensein von Schwesterchromatiden. Daher ist dieser Reparaturweg auf die G2- und Teile der S-Phase beschränkt (Rothkamm et al. 2003). Konsistent hiermit zeigten XRCC3-defiziente irs1SF-Zellen (defekt in der HR) keine Beeinträchtigung der Reparatur in der G1-Phase verglichen mit ihrem korrespondierenden Wildtyp (Abb.4.2.A). Im Gegensatz dazu zeigten die beiden NHEJ-Mutanten XRS-6 (Ku80-defizient) und V3 (defizient für DNA-PKcs) einen sehr starken Defekt in G1. Innerhalb des untersuchten Zeitraums von 6 h konnte in diesen Zellen kaum eine Abnahme der γ H2AX-Zahl beobachtet werden, während die korrespondierenden WT-Linien ein gutes Reparaturverhalten aufwiesen (Abb.4.2.A). Auch in der G2-Phase bildeten die beiden NHEJ-Mutanten einen Reparaturdefekt aus, allerdings weniger stark ausgeprägt als in der G1-Phase (Abb.4.2.C). Die langsamere Reparatur, die hier beobachtet wurde, ist darauf zurückzuführen, dass die HR die Reparatur zumindest eines Teils der in G2 erzeugten DSBs übernimmt. Dass in der G2-Phase aber auch DSBs erzeugt werden, die spezifisch über den HR-Prozess repariert werden müssen, wurde am Reparaturverhalten von irs1SF-Zellen deutlich. Diese zeigten einen leichten aber signifikanten Reparaturdefekt, der sich erst ab 2 h nach der Bestrahlung manifestierte (Abb.4.2.C). Dieses Verhalten ist konsistent mit früheren Studien zum Reparaturverhalten humaner HR-Mutanten nach Bestrahlung in der G2-Phase (Beucher et al. 2009). Für strahleninduzierte DSBs in der S-Phase wurde eine stärkere Abhängigkeit von der HR beobachtet als in G2. Etwas mehr als 50 % der initiierten γ H2AX-Foci verblieben bis nach 6 h unrepariert (Abb.4.2.B). Die untersuchten WT-Linien zeigten dagegen zwar zu Beginn eine im Vergleich zur G1- und G2-Phase verlangsamte Reparatur-Kapazität, nach 6 h wurde aber kaum noch eine erhöhte Foci-Zahl detektiert. Auch in den beiden NHEJ-defizienten Zelllinien trat ein signifikanter Reparaturdefekt in der S-Phase auf, der jedoch etwas schwächer ausgeprägt war als in irs1SF-Zellen (Abb.4.2.B). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass es auch in der S-Phase unterschiedliche Arten von DSBs gibt, die für einen der beiden Reparaturwege determiniert sind. Im Gegensatz zur G2-Phase ist das Gleichgewicht in der S-Phase aber deutlich in Richtung HR verschoben.

Zusammengefasst zeigen die erhaltenen Ergebnisse, dass γ H2AX-Foci auch in der S-Phase einen zuverlässigen Marker für strahleninduzierte DSBs darstellen. Insbesondere die Beobachtung, dass die γ H2AX-Induktionswerte in einem aufgrund des DNA-Gehalts zu erwarteten Bereich lagen, verdeutlicht die generelle Übertragbarkeit der Methode auf die S-Phase. Im Folgenden sollte die Methode der kombinierten γ H2AX/BrdU-Immunfluoreszenzfärbung nun auch auf die Untersuchung MMS-induzierter γ H2AX-Foci in der S-Phase übertragen werden.

4.1.3 Zellzyklus-spezifische Bestimmung der γ H2AX-Induktion nach einer Behandlung mit MMS

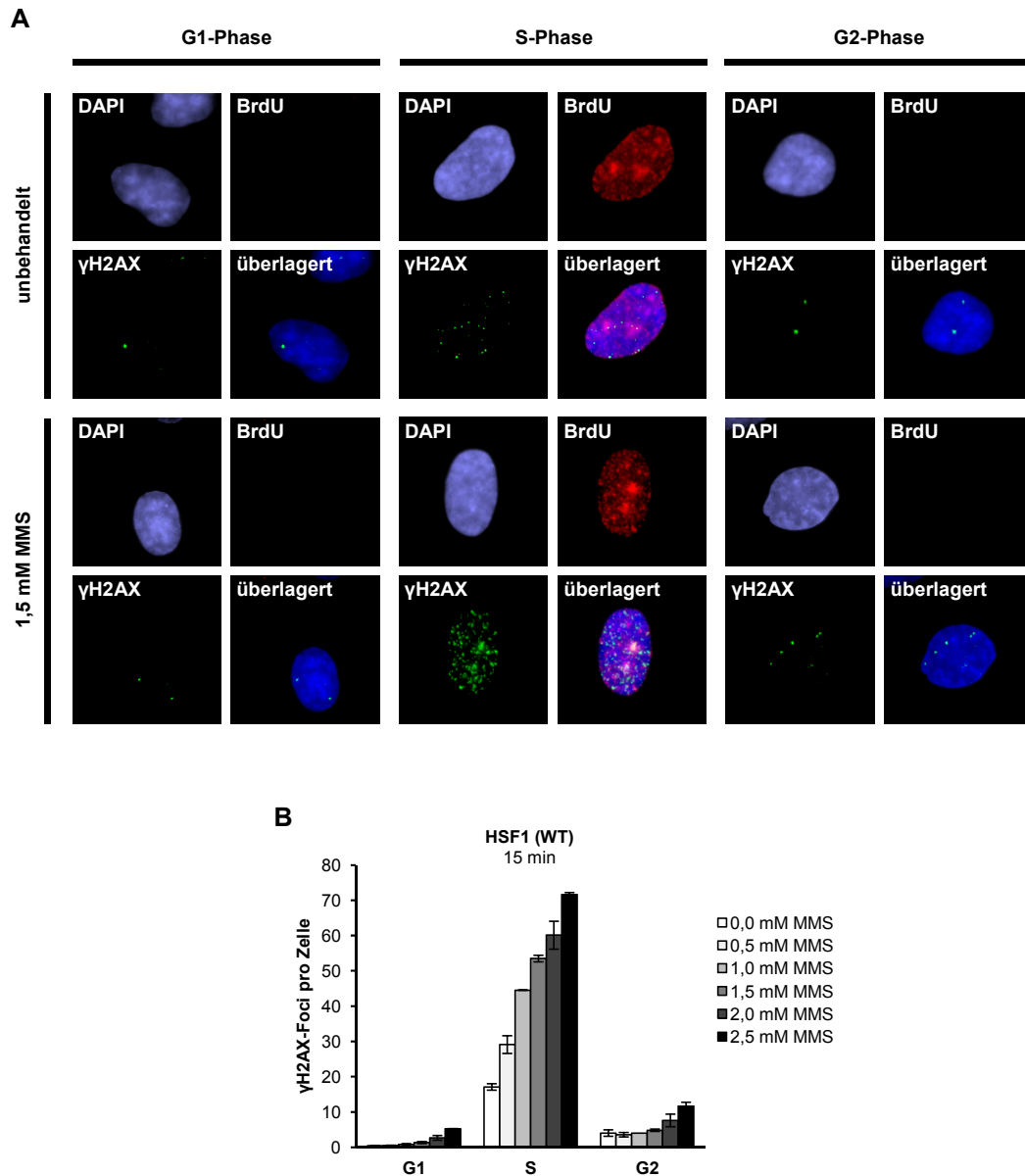


Abb.4.3: Zellzyklus-spezifische Induktion von γ H2AX-Foci nach unterschiedlichen MMS-Behandlungen

Exponentiell wachsende WT-Fibroblasten (HSF1) wurden für 1 h mit 10 μ M BrdU und unterschiedlichen Konzentrationen MMS behandelt. 15 min nach Entfernen der Chemikalien wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen γ H2AX (grün) und BrdU (rot) gefärbt. Pro Ansatz wurde die Anzahl an γ H2AX-Foci in je 40 Zellen in der G1-, S- und G2-Phase bestimmt. Immunfluoreszenzaufnahmen (aufgenommen bei 1000facher Vergrößerung) repräsentativer Zellen (unbehandelt oder nach 1,5 mM MMS) sind in (A), die erhaltenen γ H2AX-Werte in (B) dargestellt. Die Datenpunkte geben die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten an, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Frühere Studien erbrachten bereits Hinweise darauf, dass durch eine MMS-Behandlung γ H2AX-Foci während der S-Phase induziert werden (Pascucci et al. 2005). Diese Theorie sollte zunächst mit Hilfe der spezifischen γ H2AX/BrdU-Immunfluoreszenzanalyse überprüft werden. Analog zur Untersuchung strahleninduzierter γ H2AX-Foci in CHO-Zellen (Abb.4.2) wurde eine exponentiell wachsende Fibroblasten-Linie (HSF1) für 1 h mit 10 μ M BrdU und unterschiedlichen Konzentrationen MMS (0,5 – 2,5 mM) behandelt. Nach einer Reparaturzeit von 15 min wurden die Zellen fixiert und anschließend einer Immunfluoreszenzfärbung gegen γ H2AX und BrdU unterzogen. Die Anzahl an γ H2AX-Foci wurde spezifisch für G1-, S- und G2-Zellen bestimmt. Die erhaltenen Daten sowie repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen für MMS-behandelte Zellen sind in Abb.4.3 dargestellt.

Für die Induktion von γ H2AX-Foci nach einer MMS-Behandlung wurde eine deutliche Abhängigkeit von der Zellzyklusphase beobachtet. Während bis zu einer Konzentration von 1,5 mM MMS kaum eine Zunahme an γ H2AX-Foci in G1- und G2-Zellen beobachtet wurde, zeigten S-Phase-Zellen schon bei der niedrigsten eingesetzten MMS-Konzentration eine messbare Induktion an γ H2AX-Foci. Die Anzahl induzierter γ H2AX-Foci stieg dabei im untersuchten Konzentrationsbereich proportional mit der applizierten MMS-Dosis an. Erst bei sehr hohen MMS-Konzentrationen (≥ 2 mM) wurde auch in G1- und G2-Zellen eine leichte Zunahme an γ H2AX-Foci detektiert.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass MMS in einem Konzentrationsbereich bis 1,5 mM γ H2AX-Foci nur während der S-Phase induziert, und unterstützen die Annahme eines Zusammenhangs zwischen der schädigenden Wirkung von MMS und der Replikation. Zwar scheint bei höheren MMS-Konzentrationen auch ein Replikations-unabhängiger Weg zu existieren, der zur Ausbildung von γ H2AX-Foci beiträgt, dieser kann aber vernachlässigt werden.

4.1.4 Bestimmung des Beitrags der Kinasen ATM, ATR und DNA-PK bei der Phosphorylierung von H2AX nach MMS

Die in der S-Phase detektierten MMS-induzierten γ H2AX-Foci sollten nun genauer charakterisiert werden. Dabei lag der Fokus auf der Frage, welche Kinasen zur Phosphorylierung von H2AX an diesen Replikations-assoziierten Schäden beitragen. Nach dem Auftreten eines DSBs in der G1- oder G2-Phase werden die H2AX-Moleküle im Bereich des Bruchs sehr schnell durch die Kinase ATM phosphoryliert. In der Abwesenheit von ATM (z. B. in ATM-defizienten Zellen) kann diese Funktion aber auch von der DNA-PK übernommen werden (Stiff et al. 2004). Die Aktivierung dieser Kinasen erfolgt dabei durch die Struktur des DSBs. Die Kinase ATR wird dagegen durch einzelsträngige DNA-Bereiche (vor allem an Replikationsgabeln) aktiviert und kann somit zur Phosphorylierung von γ H2AX während der S-Phase beitragen (Abraham et al. 2001, Zou + Elledge 2003). In der G1- und G2-Phase wird ATR dagegen nicht bzw. nicht initial aktiviert.

Im Gegensatz zur Situation in G1 und G2, ist die Beteiligung der drei Kinasen an der Ausbildung Strahlen- und MMS-induzierter γ H2AX-Foci in der S-Phase noch weitgehend unbekannt. Zur Klärung dieser Frage wurden humane Zellen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, nach Bestrahlung oder nach MMS-Behandlung γ H2AX-Foci in Abwesenheit einer oder mehrerer dieser Kinasen auszubilden. Dafür wurden im Falle von ATM und DNA-PK spezifische Inhibitoren verwendet, die den Zellen 1 h vor der weiteren Behandlung zugegeben und bis zur Fixierung auf den Zellen belassen wurden. Da für die Kinase ATR keine spezifischen Hemmstoffe bekannt sind, wurden zusätzlich F02-98 hTert-Zellen verwendet, die einen Defekt im *ATR*-Gen tragen und nur eine ATR-Restaktivität besitzen (O'Driscoll et al. 2003). 1 h nach Zugabe der Inhibitoren (entweder alleine oder in Kombination) auf die WT- und ATR-defekten Zellen wurden diese für 1 h mit 10 μ M BrdU inkubiert. Bei Proben, die mit 1,5 mM MMS behandelt wurden, erfolgte dies zeitgleich mit der BrdU-Markierung. Im Falle einer Bestrahlung (2 Gy) wurde diese direkt nach der BrdU-Markierung durchgeführt. Alle Ansätze wurden 15 min nach der Schadensinduktion fixiert und nach einer γ H2AX/BrdU-Färbung wurde die Anzahl an γ H2AX-Foci in BrdU-positiven S-Phase und BrdU-negativen G2-Phase-Zellen bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb.4.4 dargestellt.

In unbehandelten HSF1-Zellen blieb die Anzahl an γ H2AX-Foci bei allen Inhibitor-Ansätzen unverändert. Weder die Zugabe eines der beiden eingesetzten Inhibitoren noch eine Kombination beider Hemmstoffe führte zu einer Reduktion der γ H2AX-Foci in der S- und der G2-Phase (Abb.4.4.A). Das alleinige Vorhandensein der Kinase ATR scheint somit für die Phosphorylierung von H2AX an spontanen DNA-Schäden ausreichend zu sein. Diese Funktion kann anscheinend aber auch von ATM oder der DNA-PK übernommen werden, denn auch in ATR-defizienten Zellen blieb die Zahl an γ H2AX-Foci bei Zugabe eines der beiden Inhibitoren unverändert. Lediglich in dem Ansatz, in dem ATR-defiziente Zellen mit beiden Inhibitoren behandelt wurden, trat eine Reduktion an γ H2AX-Foci auf (Abb.4.4.A). Ähnliches wurde auch nach MMS-Behandlung beobachtet. Bei keiner der untersuchten Bedingungen konnte in HSF1-Zellen eine Abnahme der Anzahl an γ H2AX-Foci in S-Phase-Zellen detektiert werden (Abb.4.4.B). Wie bei den spontanen γ H2AX-Foci trat eine Reduktion an γ H2AX-Foci nur in F02-98 hTert-Zellen auf, welche sowohl mit dem ATM- als auch dem DNA-PK-Inhibitor behandelt wurden (Abb.4.4.B). Nach MMS war diese Reduktion der Foci-Zahl aber deutlich stärker ausgeprägt als in unbehandelten Zellen. Diese Beobachtungen deuten auf eine Redundanz der drei untersuchten Kinasen für diese Art von γ H2AX-Foci hin. Wie schon im vorherigen Experiment beobachtet (vergl. Abb.4.3), führte auch in diesem Ansatz eine Behandlung mit 1,5 mM MMS nicht zu zusätzlichen γ H2AX-Foci in G2-Zellen (Abb.4.4.B).

Für strahleninduzierte γ H2AX-Foci konnten Unterschiede in der Kinase-Abhängigkeit im Vergleich zu Replikations-assoziierten DSBs beobachtet werden. Hier führte eine gemeinsame Behandlung mit ATM- und DNA-PK-Inhibitoren zu einer deutlichen Abnahme an γ H2AX-Foci in HSF1-Zellen (Abb.4.4.C). In der S-Phase lag die in diesem Ansatz ermittelte γ H2AX-Zahl

von etwa 20 Foci pro Zelle nur leicht höher als die Zahl spontaner γ H2AX-Foci in unbehandelten Zellen (Abb.4.4.A). In G2-Zellen war die Reduktion sogar noch stärker ausgeprägt. Im Gegensatz zur Situation nach MMS oder in unbehandelten Zellen ist nach einer Bestrahlung die alleinige Aktivität von ATR somit nicht ausreichend für eine H2AX-Phosphorylierung an allen DSBs. Dies verdeutlicht, dass ATR zwar durch einzelsträngige Bereiche an Replikationsgabeln aktiviert werden kann, strahleninduzierte DSBs, die Replikations-unabhängig entstehen, stellen aber kein initiales Substrat für ATR da. Konsistent hiermit hatte eine ATR-

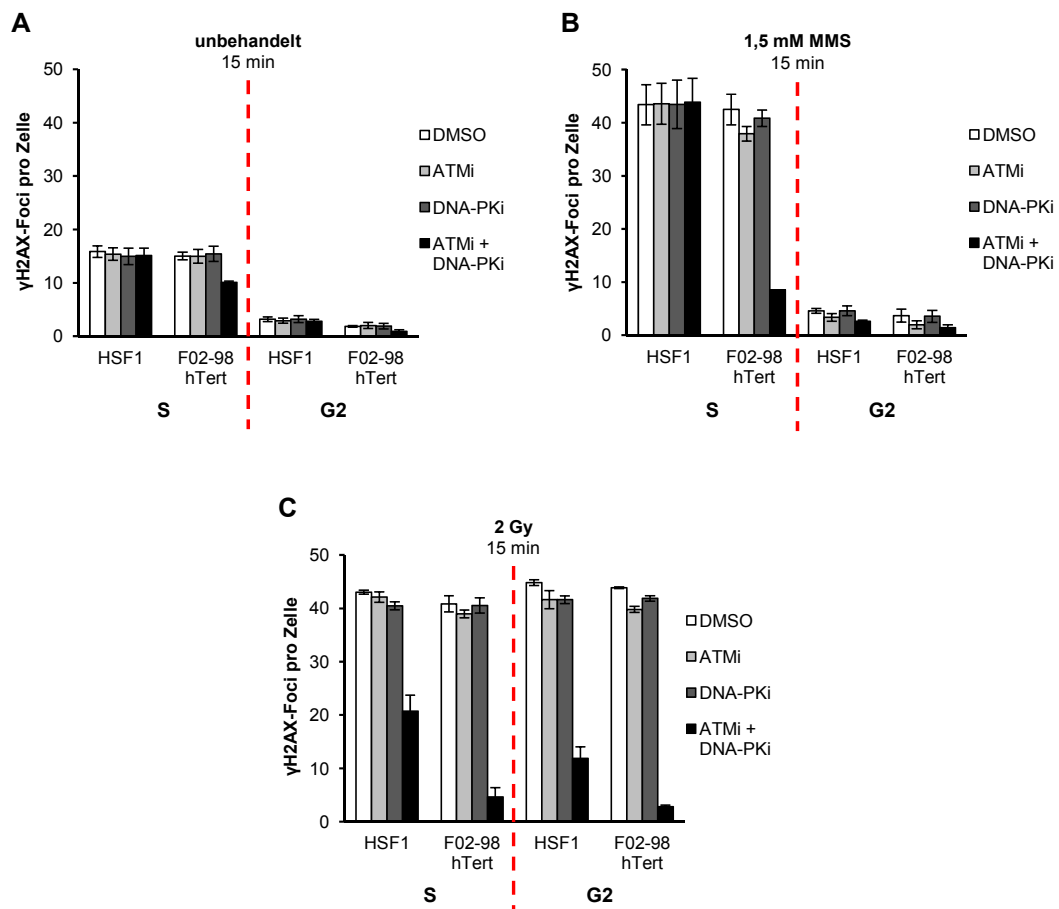


Abb.4.4: Abhängigkeit MMS- und strahleninduzierter γ H2AX-Foci von den Kinasen ATM, ATR und DNA-PK

Um die Kinasen ATM und DNA-PK auszuschalten wurden exponentiell wachsende WT-Fibroblasten (HSF1) mit spezifischen Inhibitoren gegen ATM (10 μ M) und DNA-PK (20 μ M) behandelt. Diese wurden 1 h vor der Schadensinduktion zugegeben und die Behandlung wurde bis zur Fixierung der Zellen aufrechterhalten. Die Inhibitoren wurden entweder alleine oder in Kombination eingesetzt, Proben ohne Inhibitor wurde ein vergleichbares Volumen DMSO zugegeben. Um zusätzlich den Einfluss der Kinase ATR zu beurteilen wurden ATR-defiziente Fibroblasten (F02-98 hTert) untersucht, die analog zu den WT-Zellen behandelt wurden. Für die Schadensinduktion wurden die Zellen für 1 h mit 10 μ M BrdU und 1,5 mM MMS behandelt (**B**) bzw. 1 h mit BrdU inkubiert und anschließend mit 2 Gy bestrahlt (**C**). Ferner wurden ungeschädigte Zellen untersucht, welche lediglich für 1 h mit BrdU behandelt wurden (**A**). Nach einer Reparaturzeit von 15 min wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen γ H2AX und BrdU gefärbt. Pro Ansatz wurde die Zahl an γ H2AX-Foci in je 40 Zellen in der S- und G2-Phase analysiert. Die Balken zeigen die Mittelwerte aus 3 – 4 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an.

Defizienz keinen Einfluss auf die Ausbildung strahleninduzierter γ H2AX-Foci in der S- oder der G2-Phase (Abb.4.4.C). Das Unvermögen der ATR-Kinase in der G2-Phase H2AX an strahleninduzierten DSBs zu phosphorylieren wurde bereits in früheren Studien beschrieben (Löbrich et al. 2010) und kann so auch auf eine Bestrahlung in der S-Phase übertragen werden. Im Gegensatz dazu können sich ATM und die DNA-PK bei der Phosphorylierung von H2AX an strahleninduzierten DSBs in der S- und der G2-Phase ersetzen, denn in allen Ansätzen war das Vorhandensein nur einer dieser Kinasen ausreichend für die Ausbildung der vollen Anzahl an γ H2AX-Foci (Abb.4.4.C).

Die Beobachtung, dass die Ausbildung von γ H2AX-Foci nach Bestrahlung in der S-Phase die gleiche Abhängigkeit von den untersuchten Kinasen zeigt wie in der G2-Phase, unterstützt die Annahme einer Übertragbarkeit der γ H2AX-Immunfluoreszenzanalyse auf die S-Phase. Auch die redundante Funktion der Kinasen bei Replikations-assoziierten γ H2AX-Foci erscheint plausibel. Zusammen mit der Beobachtung, dass die H2AX-Phosphorylierung auch in der S-Phase unter Bedingungen einer simulierten Defizienz für alle drei Kinasen ausbleibt, bekräftigt dies die Theorie, dass MMS-induzierte γ H2AX-Foci Replikations-assoziierte DNA-Schäden kennzeichnen. γ H2AX-Foci stellen somit eine gute Möglichkeit zur Untersuchung dieser Schäden in der S-Phase dar.

4.2 Charakterisierung des Reparaturverhaltens MMS-induzierter γ H2AX-Foci

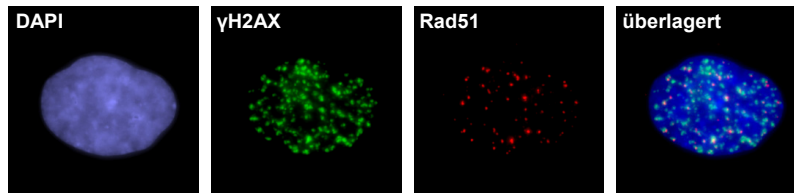
Mit der kombinierten γ H2AX/BrdU-Immunfluoreszenzfärbung wurde eine effektive und spezifische Methode zur Untersuchung MMS-induzierter DNA-Schäden etabliert. In den ersten Experimenten wurde gezeigt, dass MMS konzentrationsabhängig γ H2AX-Foci während der S-Phase induziert. Im Folgenden sollte nun die Reparatur dieser MMS-induzierten Schäden im Zusammenspiel mit der Proliferation der Zellen im Zellzyklus genauer untersucht werden.

4.2.1 γ H2AX-Reparaturkinetiken nach unterschiedlichen MMS-Konzentrationen

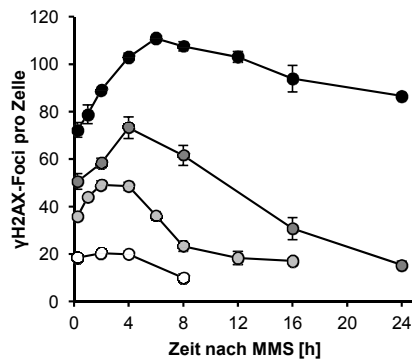
Zur Untersuchung der Reparaturvorgänge MMS-induzierter Schäden wurde zunächst die zeitliche Entwicklung an MMS-induzierten γ H2AX-Foci analysiert. Dazu wurden in HSF1-Zellen γ H2AX-Reparaturkinetiken nach unterschiedlichen MMS-Behandlungen erstellt. Nach einer 1-stündigen Behandlung mit BrdU (bzw. EdU) und unterschiedlichen Konzentrationen MMS wurden die Zellen nach unterschiedlichen Zeiten fixiert und anschließend gegen γ H2AX und BrdU bzw. EdU gefärbt. Durch Analyse der γ H2AX-Foci in BrdU-markierten Zellen wurde dann das Reparaturverhalten für die einzelnen Bedingungen untersucht. Neben dem DSB-Marker γ H2AX wurden die Zellen auch gegen Rad51 gefärbt. Rad51-Foci treten nur während der HR auf und stellen somit einen spezifischen HR-Marker dar. Durch die

Analyse dieser HR-Foci sollte eine erste Einschätzung darüber gewonnen werden, über welchen Weg die Reparatur der MMS-induzierten Schäden erfolgt. Die erhaltenen γ H2AX- und Rad51-Kinetiken sowie Immunfluoreszenzaufnahmen einer γ H2AX/Rad51-Doppelfärbung sind in Abb.4.5 dargestellt.

A



B



C

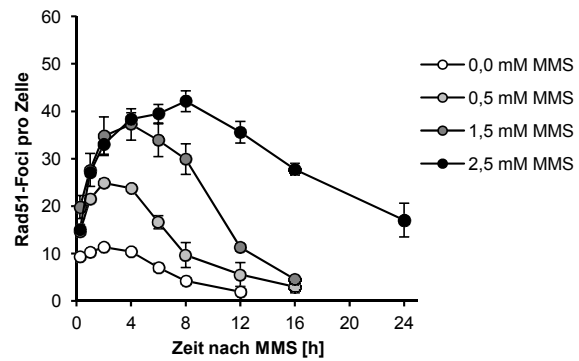


Abb.4.5: γ H2AX- und Rad51-Reparaturkinetiken in HSF1-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen MMS

Exponentiell wachsende WT-Fibroblasten (HSF1) wurden für 1 h mit 10 μ M BrdU bzw. EdU und den angegebenen Konzentrationen MMS behandelt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten (15 min – maximal 24 h) wurden die Zellen fixiert und anschließend immunfluoreszenztechnisch gegen γ H2AX bzw. Rad51 sowie BrdU bzw. EdU gefärbt. **(A)** Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen einer gegen γ H2AX (grün) und gegen Rad51 (rot) gefärbten HSF1-Zellen, 4 h nach einer Behandlung mit 1,5 mM MMS (aufgenommen bei 1000facher Vergrößerung). **(B + C)** γ H2AX- und Rad51-Reparaturkinetiken. Die Untersuchungsdauer bei den verschiedenen MMS-Konzentrationen wurde durch den Zeitpunkt bestimmt, bei dem die BrdU- bzw. EdU-markierten Zellen mehrheitlich in die G1-Phase übergangen und von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Pro Zeitpunkt wurde die Foci-Zahl in je 40 BrdU- bzw. EdU-markierten Zellen bestimmt. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an.

Die erhaltenen Reparaturkinetiken MMS-induzierter γ H2AX-Foci zeichneten sich durch einen charakteristischen Verlauf aus, der geprägt war von einem Anstieg der Foci-Zahl in den ersten Stunden nach der MMS-Behandlung und einer anschließenden, langsamen Abnahme an γ H2AX-Foci (Abb.4.5.B). Die Stärke der γ H2AX-Zunahme sowie die Zeitspanne, in der sie beobachtet wurde, stiegen dabei mit der applizierten MMS-Dosis an. So wurde das γ H2AX-Maximum nach 0,5 mM MMS beispielsweise schon nach 2 h erreicht, während die

Foci-Zahl nach 2,5 mM MMS bis 6 h anstieg. Eine Dosis-Abhängigkeit war auch beim Rückgang der γ H2AX-Foci zu erkennen, welcher mit zunehmender MMS-Konzentration langsamer erfolgte. Neben γ H2AX-Foci konnten nach MMS-Behandlung auch Rad51-Foci detektiert werden. Die Anzahl an ausgebildeten Rad51-Foci, die generell kleiner sind als γ H2AX-Foci, lag bei allen Konzentrationen etwa bei 50 % verglichen mit der maximalen γ H2AX-Zahl, wobei die Rad51-Foci immer mit γ H2AX-Foci kolokalisierten (Abb.4.5.A). Ähnlich wie bei γ H2AX zeigten auch die Rad51-Kinetiken einen biphasischen Verlauf mit einer initialen Phase der Ausbildung der Foci und einer anschließenden Phase des Rückgangs an Rad51-Foci. Die Abnahme an Rad51-Foci erfolgte dabei etwas schneller, als es für γ H2AX beobachtet wurde. Die Zeitpunkte der Foci-Maxima waren aber für γ H2AX und Rad51 vergleichbar (Abb.4.5.C).

Das Auftreten von Rad51-Foci, die Kolokalisation mit γ H2AX-Foci und der ähnliche Verlauf der γ H2AX- und Rad51-Kinetiken sind erste Hinweise dafür, dass die HR an der Reparatur MMS-induzierter Schäden beteiligt ist. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen zahlreicher Studien, die der HR hierbei eine entscheidende Rolle zugeschrieben haben (Lundin et al. 2005, Hinz et al. 2006).

4.2.2 Untersuchung der Auswirkung einer MMS-Behandlung auf das Zellzyklusverhalten

Es ist bekannt, dass einige der durch MMS erzeugten, methylierten Basen für mehrere Stunden in der DNA persistieren (Osborn + Phillipse et al. 2000). Somit stellen sie über einen längeren Zeitraum ein potentiell Risiko für die Erzeugung Replikations-assoziierten DNA-Schäden dar. In den zuvor beschriebenen Versuchsansätzen zur Erstellung von γ H2AX-Kinetiken wurden die Zellen für 1 h mit BrdU und MMS behandelt. Da die Replikation in den meisten BrdU-markierten Zellen auch danach noch nicht abgeschlossen sein sollte, ist es wahrscheinlich, dass nach dieser 1-stündigen Behandlung weitere Replikationsgabeln mit MMS-induzierten Basenschäden oder deren Reparatur-Intermediaten interferieren. Der Anstieg an γ H2AX-Foci nach frühen Reparaturzeiten nach der MMS-Behandlung könnte somit die Entstehung weiterer Replikations-assoziierten Schäden widerspiegeln. Zeitgleich ablaufende Reparaturvorgänge könnten von diesem Prozess überlagert werden. Ist diese Theorie der Replikations-bedingten Neubildung von γ H2AX-Foci richtig, sollten die Reparaturkurven mit dem Fortschreiten der Replikation korreliert werden können. Um diesen Vergleich ziehen zu können, wurde der Einfluss einer MMS-Behandlung auf die Zellzyklus-Progression von replizierenden Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht.

Für die Untersuchung des Zellzyklusverhaltens wurden exponentiell wachsende HSF1-Zellen für 1 h mit 10 μ M BrdU und unterschiedlichen Konzentrationen MMS behandelt und nach unterschiedlichen Reparaturzeiten fixiert. Nachdem die Proben mit einem spezifischen BrdU-

Antikörper und dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) gefärbt wurden, erfolgte eine 2-dimensionale FACS-Analyse im Durchflusszytometer. Repräsentative FACS-Blots für die untersuchten MMS-Konzentrationen sind in Abb.4.6.A aufgeführt. Um die Zellzyklus-Progression spezifisch für die durch MMS geschädigten, replizierenden Zellen zu untersuchen, wurden in den erhaltenen FACS-Blots nur die BrdU-positiven Zellen analysiert. Diese wurden nach ihrem DNA-Gehalt den unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen zugeordnet, wobei zwischen der S-Phase, der Spät-S/G2-Phase und der G1-Phase unterschieden wurde (Abb.4.6.B). Die zeitliche Entwicklung des Anteils der BrdU-positiven Zellen in diesen Zellzyklus-Phasen ist in Abb.4.7 dargestellt.

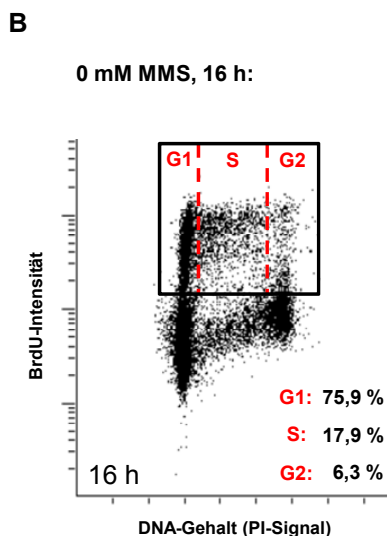
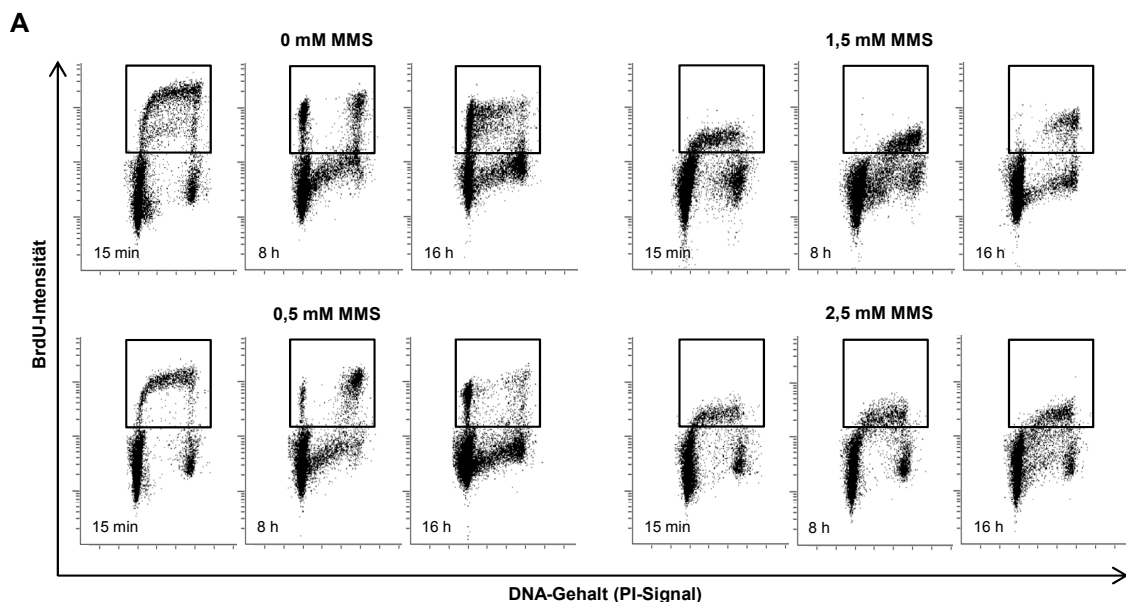


Abb.4.6: Repräsentative Auswertung einer durchflusszytometrischen Untersuchung nach MMS

Exponentiell wachsende WT-Fibroblasten (HSF1) wurden für 1 h mit 10 μ M BrdU und den angegebenen Konzentrationen MMS behandelt, nach unterschiedlichen Reparaturzeiten fixiert und einer 2-dimensionalen FACS-Färbung gegen BrdU und PI unterzogen. (A) Repräsentative FACS-Blots charakteristischer Zeitpunkte nach den unterschiedlichen Behandlungen mit MMS. Gegeneinander aufgetragen wurden die BrdU-Intensität mit logarithmischer Auftragung und der durch das PI-Signal dargestellte DNA-Gehalt mit linearer Auftragung. Die eingezeichneten Kästen markieren die Population BrdU-positiver Zellen. (B) Exemplarische Darstellung der Auswertung der erhaltenen FACS-Blots. Anhand des DNA-Gehalt wurden die BrdU-positiven Zellen der G1-, S- oder Spät-S/G2-Phase zugeordnet und der prozentuale Anteil dieser drei Populationen bezogen auf die Gesamtheit der BrdU-positiven Zellen wurde bestimmt.

Eine hemmende Wirkung von MMS auf die Replikation war in den erhaltenen FACS-Blots direkt abzulesen. Mit zunehmender MMS-Konzentration wurde hier eine immer schwächere BrdU-Intensität für die untersuchte Population replizierender Zellen detektiert (Abb.4.6.A). Dies deutet auf eine Konzentrations-abhängige Verlangsamung der Replikation hin, welche in einer geringeren Menge eingebauter BrdU-Moleküle resultiert. Diese durch MMS reduzierte Replikationsrate geht einher mit einer verlangsamten Progression der Zellen durch die S-Phase, welche schon nach geringen MMS-Konzentrationen beobachtet werden konnte. Nach einer Reparaturzeit von 4 h nach einer Behandlung mit 0,5 bzw. 1,5 mM MMS waren noch 50 % bzw. 60 % der BrdU-markierten Zellen der S-Phase zuzuordnen, während dies bei unbehandelten Zellen nur auf etwa 25 % der Zellen zutraf (Abb.4.7.A). Erst nach einer Zeit von bis zu 8 h nach der BrdU-Markierung erreichten die MMS-behandelten Zellen einen Zustand mit einem nahezu verdoppelten DNA-Gehalt, welcher der späten S- oder der G2-Phase zuzuordnen ist (Abb.4.7.B). In diesem Zeitraum wurde die Replikation in der unter-

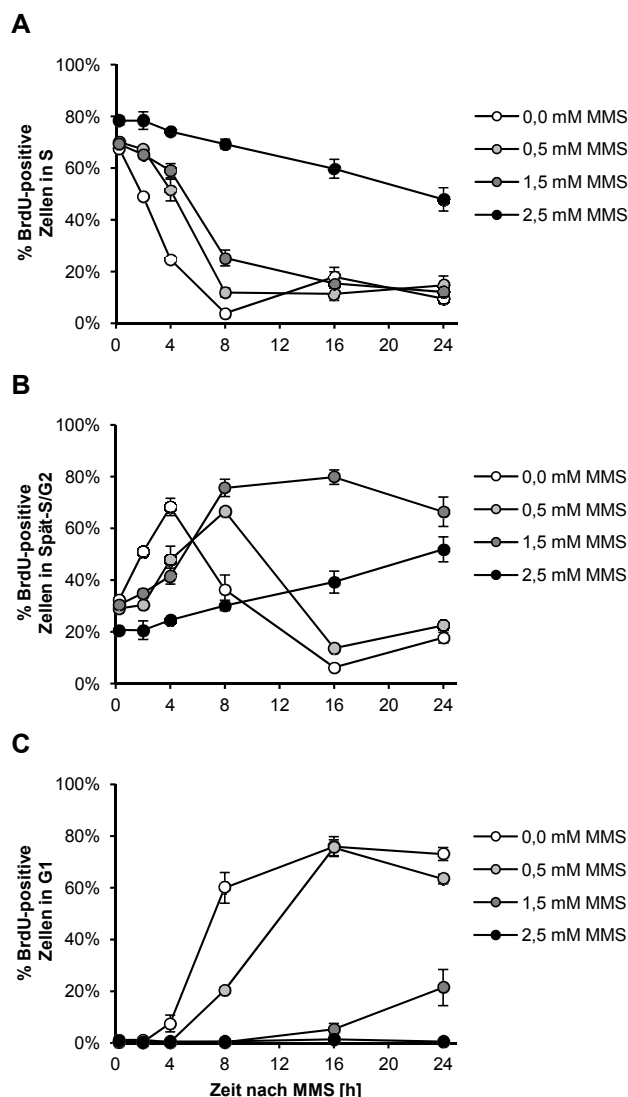


Abb.4.7: Zellzyklusverhalten von HSF1 nach unterschiedlichen MMS-Konzentrationen

WT-Fibroblasten (HSF1) wurden im exponentiellen Wachstum für 1 h mit 10 μ M BrdU und den angegebenen Konzentrationen MMS behandelt, nach unterschiedlichen Reparaturzeiten (15 min – 24 h) fixiert und einer 2-dimensionalen FACS-Färbung gegen BrdU und PI unterzogen. Die Untersuchung des Zellzyklusverhaltens erfolgte im Durchflusszytometer, wobei 15000 – 20000 Zellen pro Messpunkt analysiert wurden. Wie in Abb.4.6.B dargestellt, wurde der Anteil BrdU-positiver Zellen in der S-Phase (A), der Spät-S/G2-Phase (B) und der G1-Phase (C) bezogen auf die Gesamtheit aller BrdU-markierten Zellen ermittelt und getrennt aufgetragen. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus 2 – 6 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken verdeutlichen den Standardfehler der Mittelwerte.

suchten Zellpopulation somit weitgehend abgeschlossen. Konsistent hiermit wurde während dieser Zeitspanne auch der Beginn einer Abnahme an γ H2AX-Foci nach diesen MMS-Konzentrationen beobachtet (vergl. Abb.4.4.B). Dies unterstützt die Theorie, dass die Zunahme an γ H2AX-Foci in den ersten Stunden der Reparaturkinetik auf eine fortschreitende Replikation zurückzuführen ist und dass eine Reparatur der erzeugten DNA-Schäden erst dann detektiert werden kann, wenn die Replikation weitgehend abgeschlossen ist.

Die proliferationshemmende Wirkung von MMS scheint aber nicht nur auf eine verlangsamte Replikation zurückzuführen sein. Zusätzlich hierzu wurde ein Zellzyklus-Arrest in der Spät-S/G2-Phase beobachtet, der v.a. nach 1,5 mM MMS sehr stark ausgeprägt war (Abb.4.7.B). Nach einer Behandlung mit 0,5 mM MMS konnten nach 8 h die ersten BrdU-positiven G1-Zellen detektiert werden und im Zeitraum zwischen 8 und 16 h wurde für die Majorität der Zellen eine Progression in die G1-Phase beobachtet (Abb.4.7.C). Im Gegensatz dazu verblieben die mit 1,5 mM MMS behandelten Zellen während dieses Zeitraums fast komplett in der Spät-S/G2-Phase (Abb.4.7.B). Ein Übergang der Zellen in die G1-Phase wurde kaum beobachtet und selbst nach einer Reparaturzeit von 24 h wurden erst wenige BrdU-positive Zellen in der G1-Phase detektiert (Abb.4.7.C). Somit scheint es hier zu einem Schadens-abhängigen Zellzyklus-Arrest gekommen zu sein, welcher einen Übertritt der Zellen in die Mitose verhinderte. Ein Vergleich des Zellzyklusverhaltens mit den γ H2AX-Reparaturkinetiken (vergl. Abb.4.4.B) nach diesen beiden MMS-Konzentrationen verdeutlicht, dass eine signifikante Zunahme an G1-Zellen erst zu einem Zeitpunkt auftrat, bei dem der Großteil der induzierten γ H2AX-Foci bereits repariert worden war. Es scheint somit in der Zelle effiziente Mechanismen zu geben, die eine Zellteilung mit einer hohen Anzahl MMS-induzierter DNA-Schäden verhindern. Ob die Zellteilung erst dann eingeleitet wird, wenn alle durch MMS erzeugten Schäden repariert wurden oder ob die Zellen zum Zeitpunkt der Mitose noch ein leicht erhöhtes Schadens-Niveau aufweisen, kann mittels dieser Ergebnisse noch nicht beurteilt werden.

Einer Behandlung der Zellen mit 2,5 mM MMS hatte eine sehr starke Wirkung auf den Zellzyklus. Konsistent mit der Beobachtung, dass die Zellen unter diesen Bedingungen kaum noch BrdU in ihre DNA einbauen, wurde nur eine sehr langsame Progression der Zellen durch die S-Phase beobachtet. Selbst 24 h nach der MMS-Behandlung war ein Großteil der Zellen noch der S-Phase zuzuordnen (Abb.4.7.A). Die Replikation wurde durch diese hohe MMS-Konzentration also sehr stark gehemmt. BrdU-positive G1-Zellen wurden bei dieser Bedingung bis 24 h nicht detektiert (Abb.4.7.C).

Die γ H2AX-Reparaturkinetiken und die durchflusszytometrischen Zellzyklus-Untersuchungen verdeutlichen die reziproke Beeinflussung von Zellzyklus und Reparaturprozessen nach MMS. Die MMS-induzierten Basenschäden führen zu einer Verlangsamung der Replikation und zur Entstehung Replikations-assoziiierter DNA-Schäden, welche als γ H2AX-Foci sichtbar werden. Das charakteristische, biphasische Verhalten der γ H2AX-Kinetiken nach MMS

spiegelt dabei das Ergebnis der gegenläufigen Prozesse von Ausbildung und Reparatur der γ H2AX-Foci wider. Die langsam ablaufende Reparatur der Replikations-assoziierten Schäden führt wiederum zu einem anhaltenden Zellzyklus-Arrest, der auf eine effiziente Zellzyklus-Kontrolle nach MMS hindeutet.

4.3 BER-Intermediate tragen zur DNA-schädigenden Wirkung von MMS bei

Nach der Charakterisierung der Reparaturkinetiken MMS-induzierter γ H2AX-Foci sollte nun die Entstehung dieser Foci genauer untersucht werden. Frühere Studien konnten bereits eine Phosphorylierung von H2AX nach Behandlungen mit MMS nachweisen (Pascucci et al. 2005, Staszewski et al. 2008), der molekulare Mechanismus der zur Entstehung dieser Replikations-assoziierten Schäden führt, ist aber noch unklar. Hier sind zwei unterschiedliche Szenarien denkbar. Zum einen ist bekannt, dass einige MMS-abhängige Basenschäden die Replikation blockieren können (Larson et al. 1985, Engelward et al. 1998). Wird eine Replikationsgabel dadurch längerfristig arretiert, könnte es zum Kollabieren der Replikationsgabel und einer damit verbundenen Ausbildung eines DSBs kommen. Zum anderen stellen Intermediate der Basen-Exzisionsreparatur (BER), über die die Reparatur der methylierten Basen erfolgt, einen potentiellen Ausgangspunkt für Replikations-assoziierte Schäden dar. XRCC1 und Pol β sind wichtige Faktoren der BER (Horton et al. 2008). Zellen mit einem Gendefekt in diesen Faktoren akkumulieren SSBs (Pascucci et al. 2005, Caldecott 2003) und zeigen eine Hypersensitivität gegenüber methylierenden Agenzien (Thompson et al. 1982, Sobol et al. 2003). Zudem sind Pol β - und XRCC1-defiziente Mauszellen embryonal letal (Gu et al. 1994, Tebbs et al. 1999).

4.3.1 Untersuchung des Induktions- und Reparaturverhaltens MMS-induzierter γ H2AX-Foci in XRCC1-defizienten Zellen

Um die Bedeutung dieser BER-Intermediate für die Ausbildung MMS-induzierter γ H2AX-Foci abschätzen zu können, wurde das γ H2AX-Induktions- und Reparaturverhalten nach MMS in der XRCC1-defizienten CHO-Zelllinie EM-C11 und der korrespondierenden WT-Linie CHO-9 verglichen. Dazu wurden beide Zelllinien zunächst für 1 h mit 10 μ M EdU und unterschiedlichen Konzentrationen MMS behandelt und nach einer Reparaturzeit von 15 min fixiert. Die Zellen wurden anschließend gegen γ H2AX und EdU gefärbt und die Anzahl an induzierten γ H2AX-Foci wurde sowohl in den EdU-positiven S-Phase-Zellen als auch in den EdU-negativen Zellen in der G2-Phase ermittelt. Die dabei erhaltenen Werte sowie repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen sind in Abb.4.8 dargestellt.

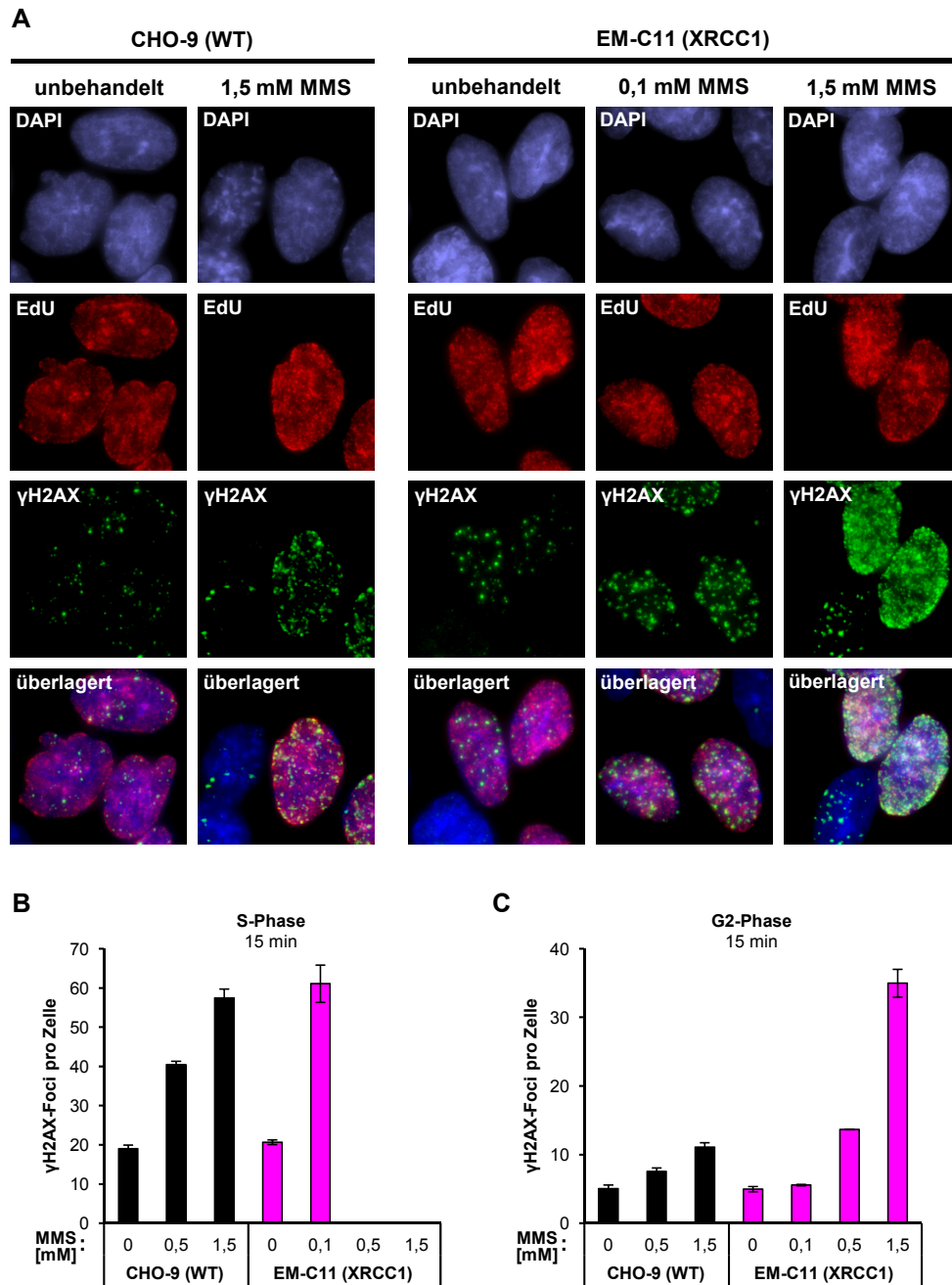


Abb.4.8: γ H2AX-Induktionsverhalten XRCC1-defizienter Zellen nach MMS

Exponentiell wachsende WT- und XRCC1-defiziente Hamster-Zellen (CHO-9 bzw. EM-C11) wurden für 1 h mit 10 μ M EdU und unterschiedlichen Konzentrationen MMS behandelt. Nach einer Reparaturzeit von 15 min wurden die Zellen fixiert und einer Immunfluoreszenzfärbung gegen EdU (rot) und γ H2AX (grün) unterzogen. **(A)** Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen MMS-behandelter Zellen, aufgenommen bei 1000facher Vergrößerung. **(B+C)** γ H2AX-Induktionswerte, 15 min nach Behandlung mit den angegebenen MMS-Konzentrationen in der S- oder der G2-Phase. Ausgewertet wurden je 40 EdU-positive S-Phase- bzw. 40 EdU-negative G2-Phase-Zellen. Eine Bestimmung der Induktionswerte von EM-C11-Zellen in der S-Phase nach einer Behandlung mit 0,5 oder 1,5 mM MMS war aufgrund der übermäßig starken γ H2AX-Induktion nicht möglich. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 – 4 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an.

XRCC1-defiziente EM-C11-Zellen zeigten in der S-Phase eine deutlich stärkere Induktion an γ H2AX-Foci nach MMS als die WT-Linie CHO-9. Bereits bei einer Konzentration von 0,1 mM MMS wurde in EM-C11 das gleiche Foci-Niveau ausgebildet wie in CHO-9 nach 1,5 mM, wobei die Zahl spontaner Foci in beiden Zelllinien vergleichbar war (Abb.4.8.B). Die durch den Gendefekt verursachte Akkumulation von BER-Intermediaten in EM-C11 erhöhte die Frequenz Replikations-assoziierten Schäden nach MMS somit drastisch. Dies wurde auch bei den beiden höheren MMS-Konzentrationen (0,5 und 1,5 mM) deutlich. Hier war die Menge an induzierten γ H2AX-Foci so hoch, dass eine sichere Auswertung nicht mehr möglich war. Nach 1,5 mM MMS zeigten die BrdU-positiven Zellkerne ein einheitliches, flächiges γ H2AX-Signal, bei dem nicht zwischen einzelnen Foci unterschieden werden konnte (Abb.4.8.A). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass BER-Intermediate zur Ausbildung MMS-induzierter γ H2AX-Foci beitragen und stehen im Einklang mit den zuvor beschriebenen Studien XRCC1- und Pol β -defizienter Zelllinien.

In der G2-Phase wurde in CHO-9-Zellen nur eine schwache γ H2AX-Induktion beobachtet (Abb.4.7.C). Diese war zwar etwas stärker als in den vorherigen Experimenten mit HSF1-Zellen (siehe Abb.4.3.), verdeutlicht aber dennoch, dass ein Replikations-unabhängiger Weg nur eine geringe Rolle bei der Ausbildung MMS-induzierter γ H2AX-Foci in Wildtyp-Zellen spielt. Zurückzuführen sind die γ H2AX-Foci in der G2-Phase wohl auch auf SSBs, die während der BER auftreten. Werden durch MMS Basen methyliert, die sich in räumlicher Nähe auf den beiden gegenüberliegenden DNA-Strängen befinden, können zeitgleich ablaufende BER-Prozesse in der Ausbildung eines DSBs resultieren. Unterstützt wird dieses Modell durch die Beobachtung, dass EM-C11-Zellen auch in der G2-Phase deutlich mehr γ H2AX-Foci ausbildeten als WT-Zellen (Abb.4.8.C). Durch die Akkumulation an SSBs in EM-C11 wird die Wahrscheinlichkeit für dicht benachbarte, gegenüberliegende SSBs und somit für Replikations-unabhängige DSBs erhöht.

Nach der Beobachtung, dass EM-C11 nach 0,1 mM MMS einen vergleichbaren Induktionswert an γ H2AX-Foci ausbilden wie CHO-9 nach 1,5 mM, sollte nun mit diesen MMS-Konzentrationen das Reparaturverhalten dieser Zelllinien untersucht werden. Analog zu den in HSF1 durchgeführten Reparaturstudien (vergl. Abb.4.5) wurden γ H2AX- und Rad51-Kinetiken nach diesen beiden MMS-Behandlung erstellt. Dabei zeigten die in EM-C11 erstellten Reparaturkinetiken für γ H2AX- und Rad51-Foci nach 0,1 mM MMS ein vergleichbares Verhalten wie in CHO-9 nach 1,5 mM MMS. Über den gesamten untersuchten Zeitraum von 16 h konnten kaum Unterschiede zwischen den Reparaturkurven beobachtet werden (Abb.4.9). Dies verdeutlicht zum einen, dass der BER-Defekt in EM-C11 zwar große Auswirkungen auf die Induktion der γ H2AX-Foci hat, nicht aber auf die Reparatur der Replikations-assoziierten Schäden. Zum anderen stellt die vergleichbare Reparaturkapazität in den beiden Zelllinien einen Hinweis dafür dar, dass auch die γ H2AX-Foci im WT auf BER-Intermediate zurückzuführen sein könnten.

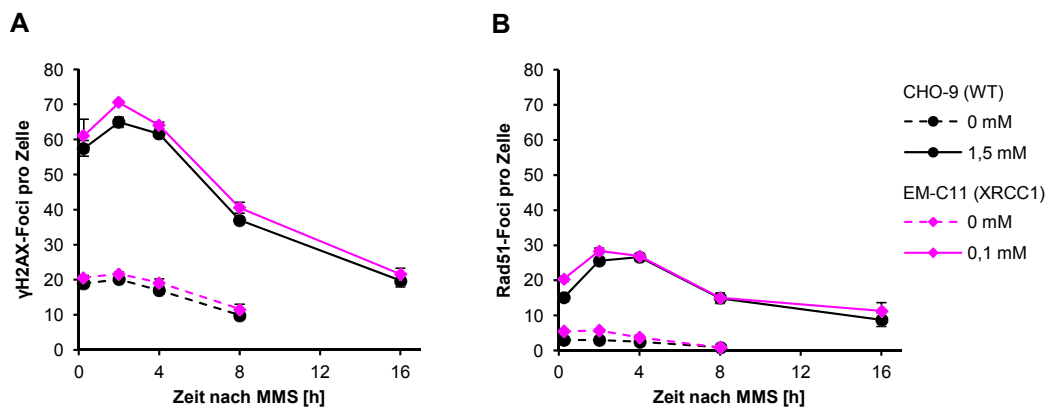


Abb.4.9: γH2AX-Reparaturverhalten XRCC1-defizienter Zellen nach MMS

Exponentiell wachsende WT- und XRCC1-defiziente Hamster-Zellen (CHO-9 bzw. EM-C11) wurden für 1 h mit 10 μM EdU und 1,5 bzw. 0,1 mM MMS behandelt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten (15 min – 16 h) wurden die Zellen fixiert und gegen EdU und γH2AX bzw. Rad51 gefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop wurde die Zahl an γH2AX-Foci (A) bzw. an Rad51-Foci (B) in je 40 EdU-markierten Zellen bestimmt. Ebenfalls dargestellt sind die Kinetiken unbehandelter Zellen. Die Datenpunkte geben die Mittelwerte aus 3 – 4 unabhängigen Experimenten wieder, die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte.

4.3.2 Untersuchung des Beitrags von BER-Intermediaten und methylierten Basen an der Replikations-hemmenden Wirkung von MMS

XRCC1-defiziente Zellen eröffnen die Möglichkeit einer genaueren Untersuchung der MMS-bedingten Verlangsamung der Replikation. Sowohl die durch BER-Intermediate arretierten bzw. kollabierten Replikationsgabeln, die zur Ausbildung von γH2AX-Foci führen, als auch die Replikationsgabeln, die direkt durch methylierte Basen blockiert werden, können potentiell zu diesem Phänomen beitragen.

Eine Einschätzung, welcher dieser beiden Prozesse wichtiger ist, sollte durch den Vergleich des Zellzyklusverhaltens von CHO-9-Zellen (WT) nach 1,5 mM MMS und XRCC1-defizienten EM-C11-Zellen nach 0,1 mM MMS getroffen werden. Nach diesen MMS-Behandlungen bilden CHO-9- und EM-C11-Zellen eine vergleichbare Anzahl an γH2AX-Foci aus. Die Anzahl an methylierten Basen, die den Primärschaden von MMS darstellen, sollte aufgrund der geringeren MMS-Konzentration in EM-C11 aber deutlich vermindert sein. Wenn diese Basenschäden bei der beobachteten MMS-abhängigen Verzögerung der Replikation von Bedeutung sind, sollten EM-C11-Zellen nach 0,1 mM MMS eine geringere Beeinträchtigung der Zellzyklus-Progression aufweisen als CHO-9-Zellen nach 1,5 mM. Sind dagegen die durch γH2AX-Foci gekennzeichneten Replikations-Schäden ursächlich für diese Verzögerung, wäre ein vergleichbares Zellzyklusverhalten der beiden Zelllinien bei den beiden unterschiedlichen MMS-Konzentrationen zu erwarten. Zusätzlich sollte auch das Zellzyklusverhalten in CHO-9-Zellen nach 0,1 mM MMS untersucht werden, also unter einer Bedingung, bei der diese Zellen eine vergleichbare Zahl an methylierten Basen aber ein

deutlich geringeres Level an γ H2AX-Foci als in EM-C11 nach dieser MMS-Konzentration aufweisen sollten. Durch den Vergleich mit der Zellzyklus-Progression von EM-C11 sollten Rückschlüsse über den Einfluss der γ H2AX-markierten Schäden auf den Zellzyklus gezogen werden.

Zur Untersuchung des Zellzyklusverhaltens bei den zuvor beschriebenen Bedingungen wurden exponentiell wachsende CHO-9- und EM-C11-Zellen für 1 h mit 10 μ M BrdU und 0,1 bzw. 1,5 mM MMS behandelt. Die Proben wurden analog zu den vorher durchgeführten Zellzyklus-Studien nach unterschiedlichen Reparaturzeiten fixiert, gegen BrdU und mit PI gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die erhaltene Verteilung der BrdU-positiven Zellen in der S-, Spät-S/G2- und G1-Phase ist in Abb.4.10 aufgetragen.

Ohne MMS-Behandlung zeigten CHO-9- und EM-C11-Zellen ein sehr ähnliches Zellzyklusverhalten. Während der ersten 6 h nach der BrdU-Markierung verlief die Progression der untersuchten BrdU-markierten Zellpopulation nahezu parallel (Abb.4.10.A). Erst zu späteren

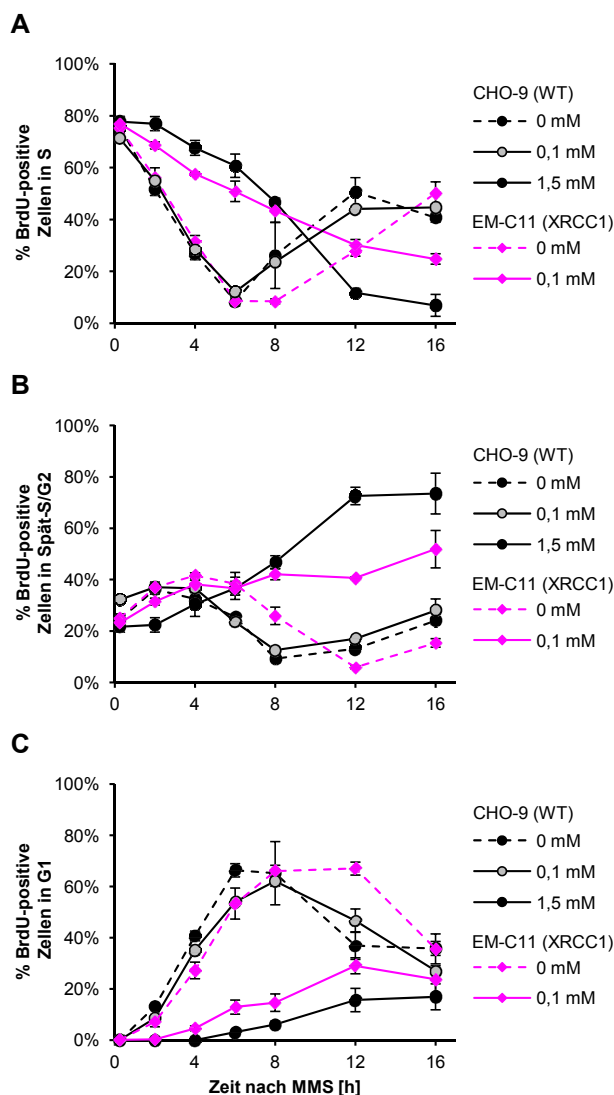


Abb.4.10: Zellzyklusverhalten MMS-behandelter CHO-9- und EM-C11-Zellen

Exponentiell wachsende WT- und XRCC1-defiziente Hamster-Zellen (CHO-9 bzw. EM-C11) wurden für 1 h mit 10 μ M BrdU und 0,1 bzw. 1,5 mM MMS behandelt, während zusätzlich Kontroll-Proben ohne MMS-Behandlung blieben. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten (15 min – 16 h) wurden die Zellen fixiert und einer 2-dimensionalen FACS-Färbung gegen BrdU und PI unterzogen. Im Durchflusszytometer wurde die Zellzyklusverteilung der einzelnen Proben bestimmt. Dabei wurden 15000 – 20000 Zellen pro Messpunkt analysiert. Die Untersuchung der Zellzyklus-Progression wurde begrenzt auf BrdU-markierte Zellen. Bezogen auf diese Population wurde der prozentuale Anteil BrdU-positiver Zellen in der S-Phase (**A**), der Spät-S/G2-Phase (**B**) und der G1-Phase (**C**) ermittelt und getrennt dargestellt. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus 2 - 4 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte wieder.

Zeiten manifestierte sich eine insgesamt etwas schnellere Zellzyklus-Progression in CHO-9. Im Gegensatz dazu unterschied sich das Zellzyklusverhalten der beiden untersuchten Zelllinien nach 0,1 mM MMS deutlich. Während in CHO-9-Zellen fast kein Einfluss der MMS-Behandlung auf das Zellzyklusverhalten detektiert werden konnte, zeigten EM-C11-Zellen eine klare Beeinträchtigung der Zellzyklus-Progression. Hier wurde sowohl eine deutliche Verlangsamung in der Progression der Zellen durch die S-Phase (Abb.4.10.A) als auch ein klar verminderter Übertritt der Zellen in die G1-Phase (Abb.4.10.C) detektiert. Dieser eindeutige Unterschied im Zellzyklusverhalten nach 0,1 mM MMS ist auf die in EM-C11 vermehrt ausgebildeten, durch γ H2AX-Foci gekennzeichneten Replikations-Schäden zurückzuführen. Dies verdeutlicht einen starken Einfluss dieser Schäden auf die Zellzyklus-Progression. Nach einer Behandlung mit 1,5 mM MMS wurde in CHO-9-Zellen eine noch stärkere Beeinträchtigung der Progression durch die S-Phase beobachtet (Abb.4.10.A) als in EM-C11-Zellen nach 0,1 mM. Dies ist auf die größere Zahl methylierter Basen bei dieser Bedingung zurückzuführen. Diese Basenschäden tragen somit ebenfalls zur hemmenden Wirkung von MMS auf die S-Phase-Progression bei. Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass die Verzögerung der Replikation nach einer MMS-Behandlung hauptsächlich auf die durch γ H2AX-Foci gekennzeichneten Replikations-Schäden zurückzuführen ist, die aus Intermediaten der BER hervorgegangen sind. Darüber hinaus scheint aber auch der Vorgang von Bedeutung zu sein, bei dem das Fortschreiten von Replikationsgabeln durch methylierte Basen transient gehindert wird.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die Experimente mit XRCC1-defizienten Zellen aufschlussreiche Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der Induktion von γ H2AX-Foci nach MMS gewonnen werden konnten. BER-Intermediate, welche bei einer XRCC1-Defizienz akkumulieren, führen zu einer starken Induktion Replikations-abhängiger γ H2AX-Foci. Dieser Prozess ist auch hauptsächlich für die nach MMS beobachtete Verlangsamung der Replikation verantwortlich, wobei hierzu auch methylierte Basen beitragen, die direkt mit der Replikationsgabel interferieren.

4.4 Beitrag von HR und NHEJ an der Reparatur MMS-induzierter γ H2AX-Foci

Aufgrund zahlreicher Überlebensstudien, die eine Hypersensitivität von HR-Mutanten gegenüber MMS beschrieben haben, wird der HR eine entscheidende Rolle bei der Reparatur MMS-induzierter DNA-Schäden zugeschrieben (Lundin et al. 2005, Hinz et al. 2006). Mit Hilfe der S-Phase-spezifischen γ H2AX-Immunfluoreszenz sollte diese Theorie nun überprüft und die Beiträge der beiden Reparaturprozesse HR und NHEJ an der Reparatur MMS-induzierter Schäden genau bestimmt werden.

4.4.1 Untersuchung des Reparaturverhaltens MMS-induzierter γ H2AX-Foci in HR- und NHEJ-defizienten humanen Fibroblasten

Für eine Bewertung der Bedeutung von HR und NHEJ nach MMS sollte das Reparaturverhalten humaner Fibroblasten-Linien mit Defekten in einem der beiden Reparaturwege untersucht werden. Verwendet wurde hierfür die HR-defiziente Fibroblasten-Linie HSC62 mit einer hypomorphen Mutation im *BRCA2*-Gen und die NHEJ-defiziente Linie 180BR mit einer hypomorphen *LigIV*-Mutation. Die Zellen wurden im exponentiellen Wachstum für 1 h mit 10 μ M BrdU bzw. EdU und 1,5 mM MMS behandelt und nach unterschiedlichen Reparaturzeiten fixiert. Eine kombinierte γ H2AX/BrdU-Immunfärbung wurde durchgeführt und die Anzahl an γ H2AX-Foci in den BrdU-markierten Zellen wurde ermittelt und mit den Werten in HSF1-Zellen (siehe Abb.4.5) verglichen. Analog dazu wurde auch eine Rad51/EdU-Doppelfärbung durchgeführt und Rad51-Foci in den EdU-positiven Zellen analysiert. Die erhaltenen γ H2AX- und Rad51-Kinetiken sind in Abb.4.11 dargestellt.

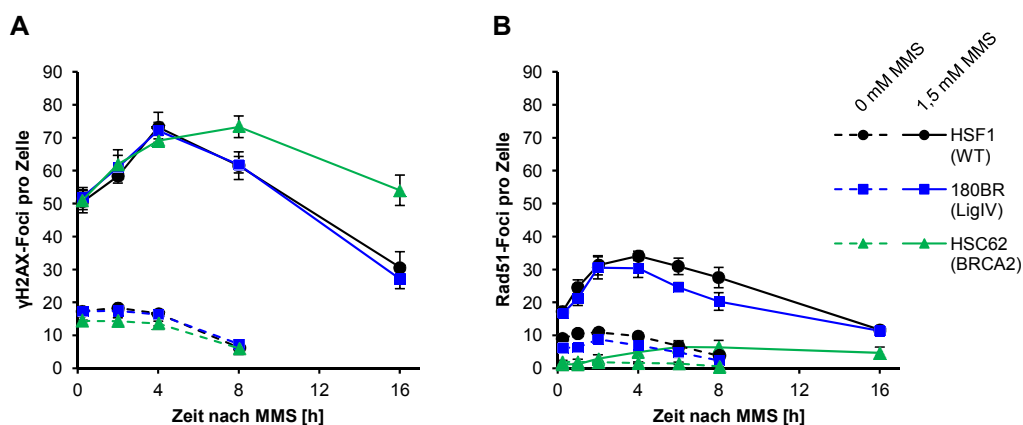


Abb.4.11: γ H2AX- und Rad51-Reparaturkinetiken HR- und NHEJ-defizienter Zellen nach einer Behandlung mit 1,5 mM MMS

Exponentiell wachsende, humane Fibroblasten-Linien mit einer Defizienz im NHEJ (180BR) oder der HR (HSC62) wurden für 1 h mit 10 μ M BrdU bzw. EdU und 1,5 mM MMS behandelt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten (15 min – 16 h) wurden die Zellen fixiert und anschließend einer kombinierten γ H2AX/BrdU- oder Rad51/EdU-Doppelfärbung unterzogen. In je 40 BrdU- bzw. EdU-positiven Zellen wurde die Anzahl an γ H2AX- (A) bzw. Rad51-Foci (B) ermittelt und mit den Werten in WT-Zellen (HSF1) verglichen (Daten aus Abb.4.5 übernommen). Ebenfalls dargestellt sind die γ H2AX- und Rad51-Kinetiken unbehandelter Zellen. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an.

Die für die LigIV-defizienten 180BR-Zellen erhaltene γ H2AX-Reparaturkinetik zeigte einen sehr ähnlichen Verlauf wie die Kinetiken in HSF1, eine Beeinträchtigung in der Reparaturkapazität dieser Zellen nach einer MMS-Behandlung wurde nicht beobachtet (Abb.4.11.A). Konsistent hiermit war auch das Verhalten beider Zelllinien auf der Ebene der Rad51-Kinetiken vergleichbar (Abb.4.11.B). Die BRCA2-defizienten HSC62-Zellen zeigten innerhalb der ersten 4 h nach der MMS-Behandlung ebenfalls keinen Unterschied zu HSF1-Zellen, danach

bildete sich aber ein starker Reparaturdefekt in diesen Zellen aus (Abb.4.11.A). Dieser macht deutlich, dass der HR eine wichtige Funktion bei der Reparatur Replikations-assoziiierter Schäden nach MMS zukommt. Passend dazu zeigten HSC62 auch einen Defekt in der Ausbildung an Rad51-Foci (Abb.4.11.B), welcher konsistent ist mit einer essentiellen Rolle von BRCA2 bei der Rekrutierung von Rad51 an resektierte DNA-Bereiche (Jensen et al. 2010). Der Reparaturdefekt in HSC62 und vor allem das uneingeschränkte Reparaturvermögen von 180BR sind starke Hinweise darauf, dass die durch γ H2AX-Foci gekennzeichneten Replikations-assoziierten DNA-Schäden nach MMS über den Weg der HR repariert werden. Der Weg des NHEJ scheint dagegen keinen Beitrag an der Reparatur dieser Schäden zu leisten. Dennoch wurde auch in HSC62 eine langsame Reparatur beobachtet (Abb.4.11.A), was auf den hypomorphen Charakter der BRCA2-Mutation (Howlett et al. 2002) zurückzuführen sein könnte. Dadurch besitzen die Zellen noch eine Restaktivität von BRCA2, die ihnen eine schwache und damit verlangsamte Reparatur ermöglichen könnte.

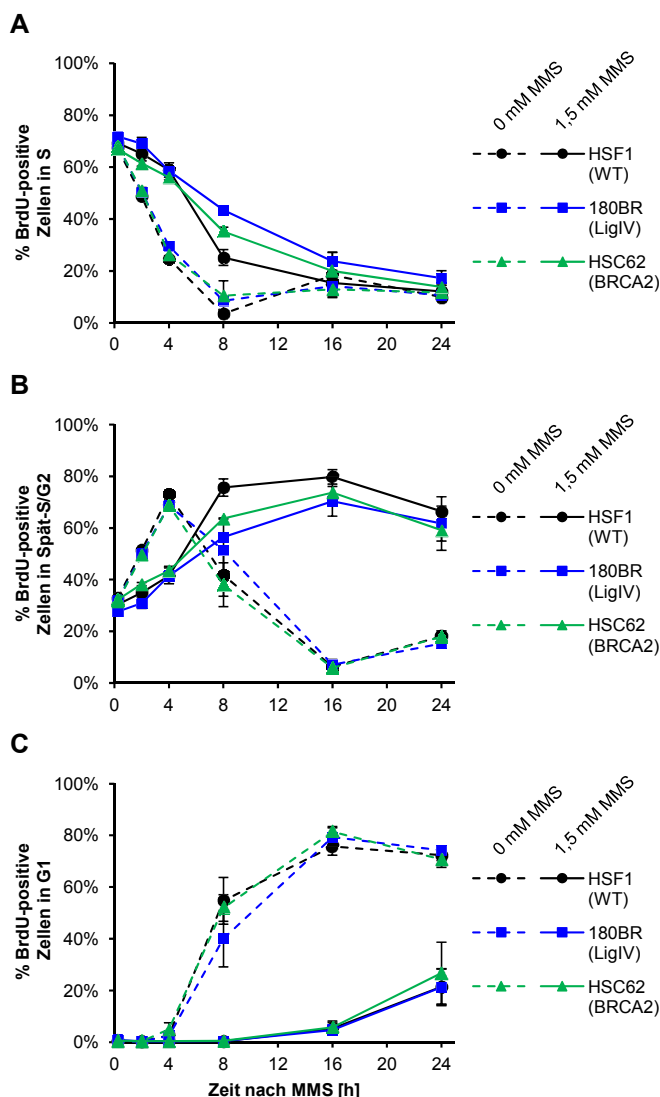


Abb.4.12: Zellzyklusverhalten von HSF1-, 180BR- + HSC62-Zellen nach 1,5 mM MMS

180BR- und HSC62-Zellen wurden im exponentiellen Wachstum für 1 h mit 10 μ M BrdU und 1,5 mM bzw. 0 mM MMS behandelt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten (15 min – 24 h) wurden die Zellen fixiert und anschließend einer 2-dimensionalen FACS-Färbung gegen BrdU und PI unterzogen. Im Durchflusszytometer wurde die Zellzyklusverteilung der einzelnen Proben bestimmt, wobei pro Messpunkt 15000 – 20000 Zellen analysiert wurden. Die Untersuchung der Zellzyklus-Progression wurde auf BrdU-markierte Zellen begrenzt. Bezogen auf diese Population wurde der Anteil BrdU-positiver Zellen in der S-Phase (**A**), der Spät-S/G2-Phase (**B**) und der G1-Phase (**C**) bestimmt und getrennt dargestellt. Die Datenpunkte spiegeln die Mittelwerte aus 3 – 4 unabhängigen Experimenten wider, die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte. Die Daten für HSF1-Zellen wurden aus Abb.4.7 übernommen.

Das veränderte Reparaturverhalten in HSC62 im Vergleich zu HSF1 und 180BR könnte aber auch auf Unterschiede in der Zellzyklus-Proliferation der Zellen zurückzuführen sein. So könnte eine langsamere Proliferation dieser Zelllinie ebenfalls in einer zeitlichen Verschiebung der γ H2AX-Kinetik resultieren. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde das Zellzyklusverhalten dieser Zelllinien nach einer Behandlung mit 1,5 mM MMS untersucht. Dazu wurden exponentiell wachsende HSC62- und 180BR-Zellen für 1 h mit 10 μ M BrdU und 1,5 bzw. 0 mM MMS behandelt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten wurden die Zellen fixiert und die Proben einer 2-dimensionalen BrdU/PI-FACS-Analyse unterzogen. Dabei wurde das Zellzyklusverhalten der BrdU-markierten Zellen untersucht und mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen in HSF1-Zellen (siehe Abb.4.7) verglichen.

HSC62- und 180BR-Zellen zeigten sowohl unbehandelt als auch nach 1,5 mM MMS ein sehr ähnliches Zellzyklusverhalten wie HSF1-Zellen. Zwar wurden bei einzelnen Zeitpunkten nach der MMS-Behandlung leichte Unterschiede zwischen den Zelllinien detektiert, dennoch kann das Zellzyklusverhalten als vergleichbar angesehen werden (Abb.4.12). Unterschiede in der Zellzyklus-Progression von HSC62 im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien können somit als Erklärung für die schlechtere γ H2AX-Reparatur-Kapazität ausgeschlossen werden. Diese Zellen bilden nach Behandlung mit MMS somit einen tatsächlichen Reparaturdefekt auf Ebene der γ H2AX-Foci aus.

4.4.2 Untersuchung des Reparaturverhaltens MMS-induzierter γ H2AX-Foci in Hamster-Zelllinien und in humanen A549-Zellen mittels RNAi-Technik

Aufgrund des hypomorphen Charakters der BRCA2-Mutation besitzen HSC62 eine Restaktivität der HR, die sich in den γ H2AX-Reparaturkinetiken dieser Zelllinie widerspiegelt (Abb.4.11.A). Um die Reparatur MMS-induzierter Replikations-Schäden unter Bedingungen einer vollständigen HR-Defizienz zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze gewählt. Für humane Fibroblasten sind keine Zelllinien bekannt, die eine komplette Defizienz für BRCA2 oder einen anderen essentiellen HR-Faktor besitzen. Im Hamster-System sind aber Zellen mit Null-Mutationen verschiedener HR-Faktoren verfügbar (Fuller et al. 1988, Hinz et al. 2006). Daher wurde zum einen das Reparaturverhalten verschiedener Reparatur-defizienter CHO-Zelllinien nach Behandlung mit MMS untersucht. In einem zweiten Ansatz wurden humane Tumorzellen für wichtige Reparaturfaktoren mit Hilfe der RNAi-Technik transient depletiert. Zu Zeitpunkten einer möglichst effizienten Depletion dieser Proteine wurde dann die Ausbildung und Reparatur MMS-induzierter γ H2AX-Foci analysiert.

Im ersten Ansatz wurden die HR-defizienten CHO-Zelllinien irs1SF und 51D1 mit dem korrespondierenden Wildtyp AA8 verwendet, die Mutationen in den Rad51-Paralogen XRCC3 bzw. Rad51D tragen. Als NHEJ-Mutanten wurden die Ku80-defiziente Zelllinie XRS-6 mit

dem korrespondierenden Wildtyp K1 und DNA-PKcs-defekte V3-Zellen mit dem komplementierten Wildtyp V3-WT eingesetzt. Analog zu den Reparaturstudien in humanen Fibroblasten wurden die exponentiell wachsenden CHO-Zellen für 1 h mit 10 μ M BrdU bzw. EdU und 1,5 bzw. 0 mM MMS behandelt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten wurden die Zellen fixiert und in einer kombinierten Immunfluoreszenzfärbung gegen γ H2AX und BrdU bzw. EdU gefärbt. Die für die BrdU- bzw. EdU-positiven Zellen erhaltenen γ H2AX-Kinetiken sind in Abb.4.13 aufgetragen.

Die beiden untersuchten HR-Mutanten zeigten ein deutlich anderes Reparaturverhalten als der korrespondierende Wildtyp AA8. Während die γ H2AX-Zahl in AA8 nach einer Plateau-Phase innerhalb der ersten 4 h nach der MMS-Behandlung deutlich abfiel, verblieben die Foci-Werte in irs1SF und 51D1 über den gesamten Untersuchungs-Zeitraum von 16 h auf einem stark erhöhten Niveau. Im Gegensatz zu den zuvor untersuchten humanen Fibroblasten konnte in den HR-defizienten CHO-Zelllinien somit keine Reparatur der MMS-induzierten

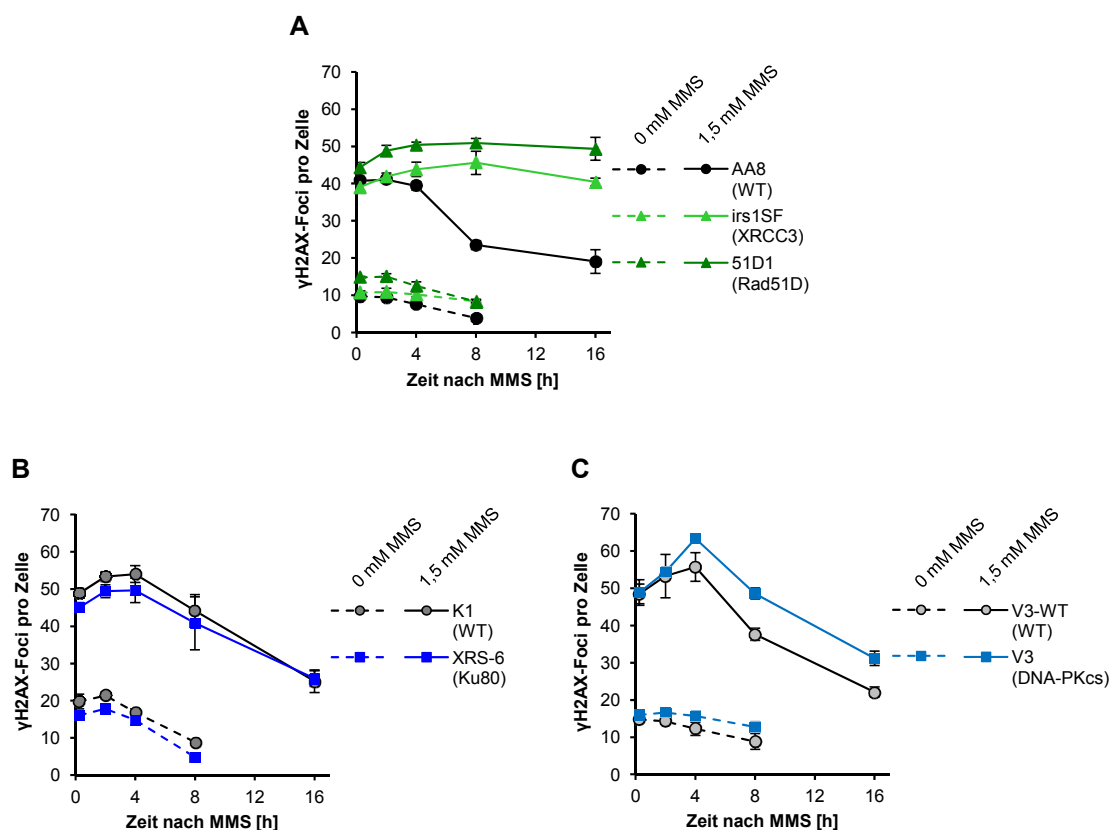


Abb.4.13: γ H2AX-Kinetiken HR- und NHEJ-defizienter CHO-Zellen nach einer Behandlung mit 1,5 mM MMS

Exponentiell wachsende CHO-Zellen mit einem Defekt im Prozess der HR (irs1SF und 51D1) (**A**) oder des NHEJ (XRS-6 und V3) (**B+C**) sowie die korrespondierenden WT-Zellen wurden für 1 h mit 10 μ M BrdU bzw. EdU und 1,5 oder 0 mM MMS behandelt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten (15 min – 16 h) wurden die Zellen fixiert und anschließend einer Doppelimmunfärbung gegen γ H2AX und BrdU bzw. EdU unterzogen. Die Anzahl an γ H2AX-Foci wurde in je 40 BrdU- bzw. EdU-positiven Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an.

DNA-Schäden beobachtet werden (Abb.4.13.A). Wie auch schon in humanen Zellen beobachtet, zeigten NHEJ-defiziente CHO-Zellen dagegen keine Beeinträchtigung der Reparaturkapazität nach MMS (Abb.4.13.B+C). So bildeten XRS-6-Zellen eine sehr ähnliche γ H2AX-Kinetik aus wie K1-Zellen. Auch V3-Zellen zeigten, obwohl sie nach 4 h eine leicht erhöhte γ H2AX-Zahl aufwiesen, zu späteren Reparaturzeiten eine vergleichbare Reparatur-Rate wie die komplementierten WT-Zellen.

Im zweiten experimentellen Ansatz sollte der HR- oder der NHEJ-Weg in menschlichen Zellen transient ausgeschaltet werden. Dazu wurden wichtige Reparaturfaktoren in humanen Tumorzellen (A549) mit Hilfe der RNAi-Technik depletiert. Für eine Inhibition der HR wurden dabei spezifische siRNAs gegen BRCA2 oder Rad51 eingesetzt. Um den NHEJ-Weg effektiv auszuschalten wurden ein kombinierter Einsatz von siRNAs gegen Ku80 und die DNA-PKcs gewählt. Kontroll-Zellen wurden mit einer unspezifischen siRNA (bezeichnet als siControl) transfiziert, welche im humanen Genom keine passende Zielsequenz besitzt. Die Transfektion mit diesen siRNAs erfolgte unmittelbar nach der Aussaat der A549-Zellen. Eine effiziente Depletion der untersuchten Faktoren wurde nach 48 h erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen mit 10 μ M EdU und 1,5 mM MMS behandelt und anschließend nach unterschiedlichen Reparaturzeiten fixiert. Dabei wurden charakteristische Zeitpunkte für die γ H2AX-Kinetiken in A549-Zellen gewählt. Nach der Fixierung der Zellen wurden diese einer Doppelimmunfärbung gegen γ H2AX und EdU unterzogen. Die Anzahl an γ H2AX-Foci wurde anschließend in je 40 EdU-positiven Zellen bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in Abb.4.14 dargestellt.

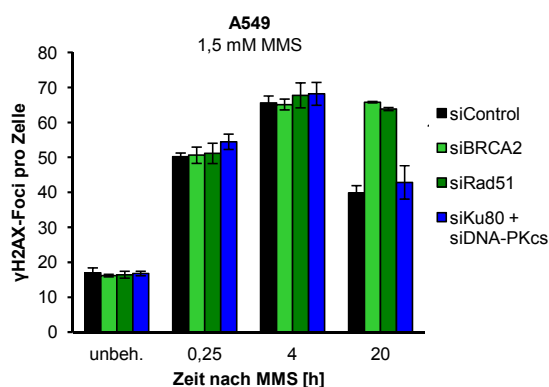


Abb.4.14: Induktion und Reparatur von γ H2AX-Foci nach 1,5 mM MMS in A549-Zellen nach Depletion unterschiedlicher Reparatur-Faktoren mittels siRNA

A549-Zellen wurden direkt nach der Aussaat mit den angegebenen siRNAs transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 1 h mit 10 μ M EdU und 1,5 mM MMS behandelt und nach unterschiedlichen Reparaturzeiten fixiert. Nach einer kombinierten γ H2AX/BrdU-Immunfärbung wurde die Zahl an γ H2AX-Foci in je 40 EdU-positiven Zellen bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus 2 – 4 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte wider.

Wie schon in humanen Fibroblasten wurde auch in A549 bei allen siRNA-Ansätzen eine vergleichbare Entwicklung an γ H2AX-Foci innerhalb der ersten 4 h nach der MMS-Behandlung beobachtet. Die Replikations-abhängige Induktion von γ H2AX-Foci erfolgt somit

unabhängig vom Vorhandensein oder Fehlen von HR- oder NHEJ-Faktoren. Nach langen Reparaturzeiten wurde in BRCA2- und Rad51-depletierten Zellen ein deutlicher Reparaturdefekt beobachtet. Zu einem Zeitpunkt von 20 h nach der MMS-Behandlung wiesen diese Zellen mit 60 γ H2AX-Foci pro Zelle einen vergleichbaren Wert wie zum Zeitpunkt von 4 h auf, an dem das Maximum an γ H2AX-Foci ausgebildet war. Dagegen lag die Anzahl an γ H2AX-Foci 20 h nach der gemeinsamen Depletion von Ku80 und der DNA-PKcs auf dem gleichen Niveau wie in Zellen mit control-siRNA (Abb.4.14).

Das mit Hilfe der siRNA-Ansätze und in den CHO-Linien beobachtete Reparaturverhalten ist ein deutliches Zeichen dafür, dass die Replikations-assoziierten Schäden, die nach MMS zur Ausbildung von γ H2AX-Foci führen, vollständig über den HR-Weg repariert werden. Der NHEJ-Weg scheint dagegen nicht zur Reparatur dieser Schäden beizutragen und einen Ausfall der HR auch nicht kompensieren zu können.

4.4.3 Bestimmung des Beitrags des NHEJ an der Reparatur MMS-induzierter γ H2AX-Foci unter Bedingungen einer HR-Defizienz

Um die Determinierung MMS-induzierter Replikations-Schäden für die HR zu verdeutlichen, wurde ein weiterer Versuchsansatz gewählt, in dem eine Defizienz in beiden Reparaturwegen simuliert wurde. Dabei sollte untersucht werden, ob eine zusätzliche Beeinträchtigung im NHEJ-Weg einen additiven Effekt auf den Reparaturdefekt von HR-defizienten Zellen nach MMS hat. Hierzu wurden sowohl im humanen als auch im CHO-System HR-defiziente Zellen mit einem spezifischen Kinase-Inhibitor der DNA-PK behandelt. Dieser wurde in einer Konzentration von 20 μ M entweder 1 h vor der MMS-Behandlung zugegeben, um die Kinase schon vor der Schadensinduktion zu hemmen, oder 5 h danach, zu einem Zeitpunkt, wenn die maximale Zahl an γ H2AX-Foci ausgebildet ist (um auszuschließen, dass ohne die Aktivität der DNA-PK weniger γ H2AX-Foci erzeugt werden). Die Zellen wurden mit 10 μ M BrdU und 1,5 mM MMS behandelt und für 24 h in der Gegenwart des DNA-PK-Inhibitors kultiviert. Nach der Fixierung der Zellen wurden sie gegen γ H2AX und BrdU gefärbt und die Anzahl an γ H2AX-Foci wurde in BrdU-positiven Zellen bestimmt (Abb.4.15).

Die zusätzliche Hemmung des NHEJ-Wegs resultierte weder in Wildtyp- noch in HR-defizienten Zellen in einem additiven Reparaturdefekt (Abb.4.15). Sowohl in humanen Fibroblasten als auch in CHO-Zellen führte die Zugabe des DNA-PK-Inhibitors zu keiner deutlichen Zunahme an γ H2AX-Foci im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Proben. Diese zeigten 24 h nach der Behandlung mit 1,5 mM MMS vergleichbare Werte, wie sie schon in den vorherigen Experimenten detektiert wurden (vergl. Abb.4.11, Abb.4.13). Konsistent mit den vorherigen Ergebnissen scheint es für die Reparatur MMS-induzierter γ H2AX-Foci nicht von Bedeutung zu sein, ob der Weg des NHEJ zur Verfügung steht oder nicht. Die durchgeführten Reparaturstudien nach MMS verdeutlichen, dass die HR entscheidend ist für die Reparatur MMS-induzierter DNA-Schäden. Selbst unter Bedingungen, bei denen die HR

nicht ablaufen kann, ist der NHEJ-Weg nicht in der Lage diese Schäden zu reparieren. Die MMS-induzierten Schäden scheinen aufgrund ihrer Struktur für die HR determiniert zu sein.

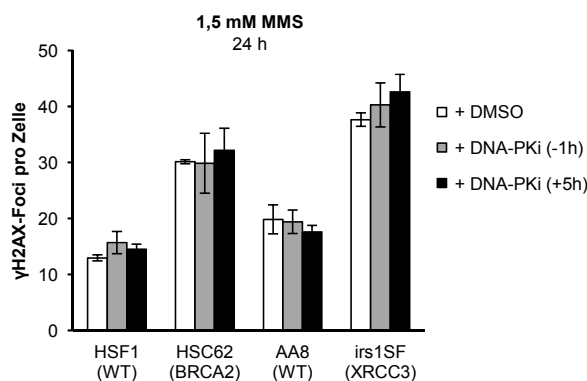


Abb.4.15: Einfluss einer Inhibition der DNA-PK auf die Reparatur MMS-induzierter γH2AX-Foci

Exponentiell wachsende WT-Zellen (HSF1 + AA8) sowie HR-defiziente Zellen (HSC62 + irs1SF) wurden für 1 h mit 10 μM BrdU und 1,5 mM MMS behandelt. Danach wurden sie für 24 h in Gegenwart oder Abwesenheit eines spezifischen Inhibitors der DNA-PK (20 μM) kultiviert. Der Inhibitor wurde 1 h vor oder 5 h nach der MMS-Behandlung zugegeben (graue bzw. schwarze Balken), Proben ohne DNA-PK-Inhibition wurden mit einem vergleichbaren Volumen DMSO versetzt (weiße Balken). Nach einer Immunfärbung gegen γH2AX und BrdU wurde die Anzahl an γH2AX-Foci in je 40 BrdU-positiven Zellen bestimmt. Die Balken zeigen die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an.

4.5 MMS-induzierte Replikations-Schäden verhindern die Einleitung der Mitose

4.5.1 Analyse MMS-induzierter γH2AX-Foci in mitotischen Zellen

Der Prozess der Zellzykluskontrolle stellt neben den unterschiedlichen Reparaturprozessen einen der entscheidendsten zellulären Mechanismen zur Bewahrung der genomischen Integrität dar. Die Induktion eines Zellzyklus-Arrests am G2/M-Checkpoint ermöglicht die Reparatur von DNA-Schäden, bevor die Zelle in die Mitose übergeht. Hier können zum Beispiel unreparierte DSBs während der Kondensation und der Trennung der Chromosomen zur Ausbildung chromosomaler Aberrationen führen, welche im Zusammenhang mit der Entartung von Zellen und maligner Transformation stehen können (Zhou et al. 2000, Jeggo + Löbrich 2006).

Frühere Studien der Arbeitsgruppe erbrachten das überraschende Ergebnis, dass der G2/M-Checkpoint relativ insensitiv für strahleninduzierte DSBs ist. Zwar wird der Checkpoint nach Bestrahlung in der G2-Phase effektiv eingeleitet, jedoch wird der Zellzyklus-Arrest schon bei einem residualen Schadens-Level von 10 – 20 γH2AX-Foci aufgehoben. Die Zellen gelangen somit mit einer erhöhten Zahl an DSBs in die Mitose, was sich auch in einer deutlichen

Zunahme chromosomaler Aberrationen widerspiegelt (Deckbar et al. 2007, Kremppler et al. 2007). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Zellzyklusstudien gaben erste Hinweise darauf, dass MMS-induzierte Schäden einen effektiveren Zellzyklus-Arrest einleiten können. Nach einer Behandlung mit 1,5 mM MMS verblieben die geschädigten Zellen über mehrere Stunden in der späten S- oder G2-Phase und erst nach sehr langen Reparaturzeiten (> 16 h) konnten die ersten MMS-behandelten Zellen in der nächsten G1-Phase nachgewiesen werden (vergl. Abb.4.7). Ein Vergleich mit den γ H2AX-Reparaturkinetiken nach 1,5 mM MMS verdeutlichte, dass ein Großteil der induzierten γ H2AX-Foci zu diesem Zeitpunkt bereits repariert worden war (Abb.4.5). Das residuale Schadens-Level, bei dem der G2/M-Checkpoint aufgehoben wird, könnte daher nach MMS niedriger sein als nach Bestrahlung.

Um diese Theorie zu überprüfen, wurde nun die Anzahl an MMS-induzierten γ H2AX-Foci spezifisch für mitotische Zellen bestimmt und mit der Situation nach Bestrahlung in der G2-Phase verglichen. Dazu wurden Wildtyp- (HSF1) und BRCA2-defiziente (HSC62) humane Fibroblasten für 1 h mit 10 μ M EdU und 1,5 bzw. 0 mM MMS behandelt und nach unterschiedlichen Zeiten fixiert. Ein Teil der Proben wurde vor der Fixierung für 3 h mit dem unspezifischen PIKK-Inhibitor Koffein (2 mM) behandelt, um die für die Aufrechterhaltung des G2/M-Checkpoints wichtigen Kinasen ATM und ATR zu hemmen. Dadurch sollte der Zellzyklus-Arrest in diesen Proben aufgehoben werden. Dies sollte zum einen zu einer Erhöhung des Anteils mitotischer Zellen führen, zum anderen sollte so aber auch untersucht werden, ob eine Aufhebung des G2/M-Checkpoints in einer Erhöhung des Schadens-Levels in der Mitose resultiert. Anhand der zuvor erstellten Zellzyklus-Messungen wurden für die Analyse des mitotischen γ H2AX-Levels Reparaturzeiten gewählt, bei denen die ersten Zellteilungen beobachtet wurden (vergl. Abb.4.12). Die 3-stündige Koffein-Behandlung vor der Fixierung erfolgte daher in einem Zeitraum von 5 – 8 h bei unbehandelten Zellen und von 16 – 19 h sowie 19 – 22 h nach MMS-Behandlung. Direkt nach dieser Behandlung wurden die Zellen fixiert. Für die Ansätze ohne Koffein-Behandlung wurde je eine Probe zum Beginn und zum Ende der zuvor angegebenen Zeitspannen fixiert (z. B. 5 h und 8 h in unbehandelten Zellen) und die ermittelten γ H2AX-Werte wurden für einen Vergleich mit den Daten nach Koffein-Zugabe gemittelt.

Um die Situation nach Bestrahlung und nach MMS vergleichen zu können wurden Zellen in der G2-Phase mit 2 Gy bestrahlt. Diesen Ansätzen wurden direkt vor der Bestrahlung 3 μ g/ml des Polymerase-Inhibitors Aphidicolin zugegeben, welcher ein Fortschreiten der Replikation hemmt. Dadurch wurden Zellen in der S-Phase arretiert, so dass nur in der G2-Phase bestrahlte Zellen in die Untersuchung eingingen. Eine EdU-Markierung wurde bei diesen Ansätzen nicht durchgeführt. Die Zellen aller Ansätze wurden mit Antikörpern gegen γ H2AX und gegen die an Serin 10 phosphorylierte Form des Histons H3 (pH3) gefärbt, die einen spezifischen Mitose-Marker darstellt (Prigent + Dimitrov 2003). Bei unbehandelten und MMS-behandelten Zellen erfolgte zusätzlich eine EdU-Färbung, so dass hier nur die EdU-po-

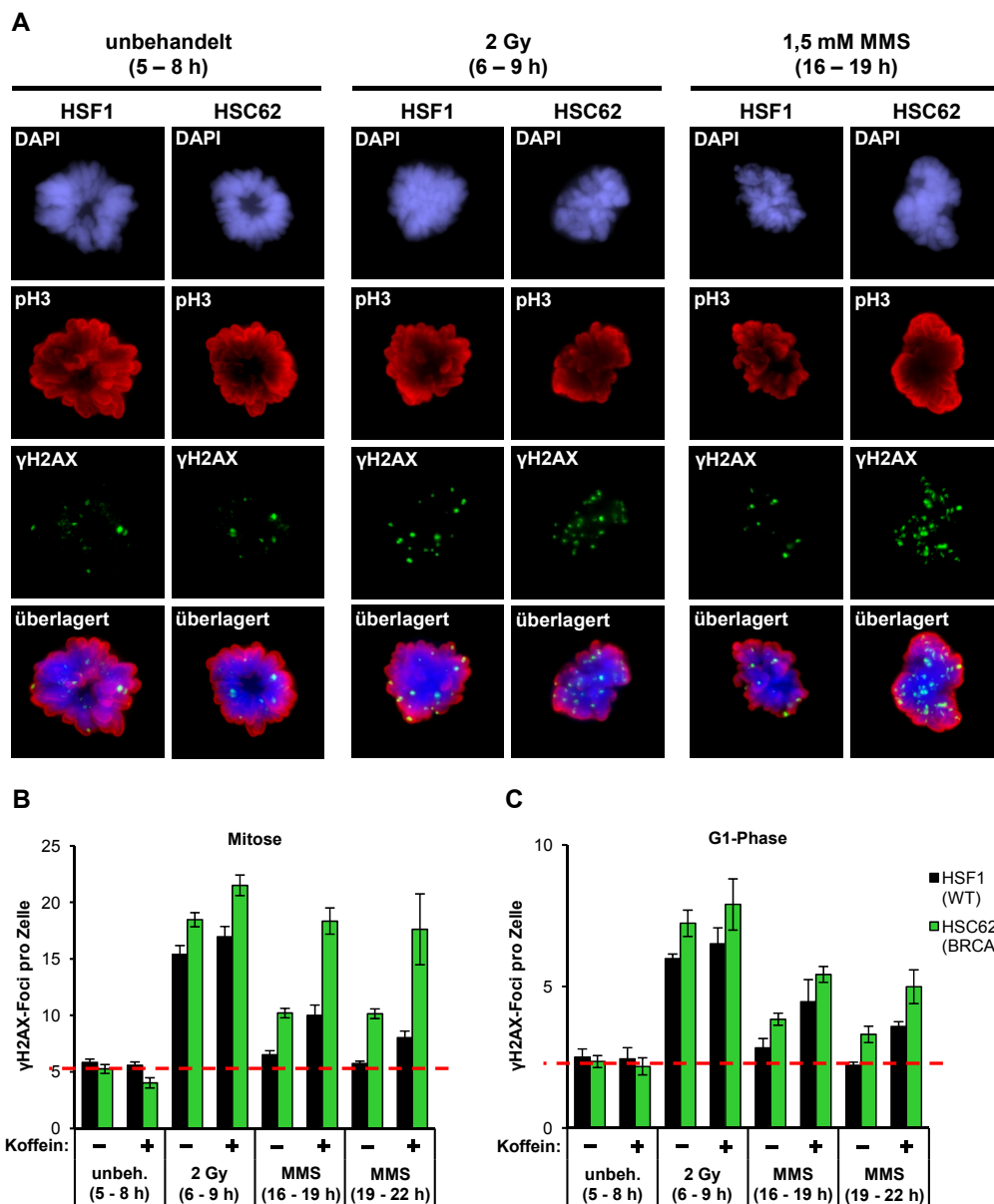


Abb.4.16: MMS-induzierte γ H2AX-Foci in mitotischen Zellen

(A) Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von γ H2AX-Foci in mitotischen HSF1- und HSC62-Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy in G2, Behandlung mit 1,5 mM MMS bzw. in unbehandelten Zellen. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 2 mM Koffein behandelt. Dargestellt sind Signale für DAPI (blau), pH3 (rot) und γ H2AX (grün), aufgenommen bei 1000facher Vergrößerung.

(B + C) Anzahl an γ H2AX-Foci in mitotischen Zellen und in frühen G1-Phasen von HSF1 und HSC62. Für die unbehandelten Ansätze und die Ansätze nach MMS wurden die Zellen für 1 h mit 10 μ M EdU und 0 bzw. 1,5 mM MMS behandelt. Bei den gekennzeichneten Ansätzen wurden die Zellen vor der Fixierung für 3 h mit 2 mM Koffein behandelt. Diese Behandlung erfolgte in einem Zeitraum von 5 - 8 h bei unbehandelten Proben und von 16 - 19 h bzw. 19 - 22 h bei MMS-behandelten Proben. Anschließend wurden die Proben fixiert. Für die Ansätze ohne Koffein wurde je eine Probe zum Beginn und zum Ende der angegebenen Zeitspanne fixiert und die für beide Proben erhaltenen γ H2AX-Werte wurden gemittelt. Bei den bestrahlten Proben wurden die Zellen mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt. Direkt vor dieser Bestrahlung wurden den Proben 3 μ g/ml Aphidicolin zugegeben um replizierende Zellen in der S-Phase zu arretieren. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 6 - 9 h wie zuvor beschrieben. Die Zellen aller Ansätze wurden mit Antikörpern gegen γ H2AX und den Mitose-Marker pH3 gefärbt, bei unbehandelten und MMS-behandelten Zellen erfolgte zusätzlich eine EdU-Färbung. Die Zahl an γ H2AX-Foci wurde für EdU-positive Mitosen bzw. G1-Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler der Mittelwerte.

sitiven Zellen ausgewertet wurden. Im Fluoreszenzmikroskop wurde anschließend die Zahl an γ H2AX-Foci in mitotischen Zellen sowie in frühen G1-Zellen bestimmt. Eine sichere Identifizierung mitotischer Zellen war anhand des pH3-Signals und der charakteristischen Morphologie der kondensierten DNA (zu erkennen anhand des DAPI-Signals) möglich (Abb.4.16.A). Ausgewertet wurden hierbei nur Zellen, die sich in der Pro- oder der Metaphase der Mitose befanden. Zellen in späteren Mitose-Stadien, in denen die Chromatiden bereits voneinander getrennt waren, gingen nicht in die Analyse ein. Frühe G1-Zellen wurden zum einen anhand ihres einfachen DNA-Gehalts (gemessen mit Hilfe des Metapher-Scan-Verfahrens) identifiziert. Zudem lagen die beiden Tochterzellen direkt nach der Zellteilung in der Regel dicht beieinander.

In unbehandelten HSF1- und HSC62-Zellen wurde eine vergleichbare Anzahl an γ H2AX-Foci in mitotischen Zellen detektiert (Abb.4.16.B). Dieses γ H2AX-Niveau war unabhängig von der Aufrechterhaltung des G2/M-Checkpoints, denn eine durch Zugabe von Koffein eingeleitete Aufhebung des Zellzyklus-Arrests zeigte keinen Einfluss auf die Zahl an γ H2AX-Foci. Nach einer Bestrahlung mit 2 Gy in der G2-Phase zeigten die Zellen in der Mitose eine deutlich Zunahme an γ H2AX-Foci im Vergleich zu unbehandelten Zellen, was die Beobachtung eines für strahleninduzierte DSBs insensitiven G2/M-Checkpoints aus früheren Studien bestätigt (Deckbar et al. 2007, Krempler et al. 2007). Eine Zugabe von Koffein hatte auch bei dieser Bedingung nur einen geringen Effekt (Abb.4.16.B). BRCA2-defiziente Zellen zeigen nach Bestrahlung in der G2-Phase einen leichten, aber signifikanten Reparaturdefekt (Beucher et al. 2009). Dieser konnte auch in den mitotischen Zellen dieser Zelllinie beobachtet werden, wo HSC62 ein im Vergleich zu HSF1 leicht erhöhtes γ H2AX-Niveau zeigten.

Nach einer Behandlung mit 1,5 mM MMS wurden in mitotischen HSF1-Zellen fast keine zusätzlichen γ H2AX-Foci im Vergleich zu den unbehandelten Proben detektiert. In den BRCA2-defizienten HSC62-Zellen wurde dagegen eine leichte Zunahme des γ H2AX-Niveaus beobachtet (Abb.4.16.B). Diese war jedoch nicht sehr stark ausgeprägt und zeigte keine Korrelation zu dem sehr starken γ H2AX-Reparaturdefekt dieser Zelllinie, der in den Zellzyklus-Stadien vor der Mitose beobachtet wurde (Abb.4.11). Dieses im Vergleich zu bestrahlten Zellen deutlich geringere Schadens-Level in mitotischen Zellen unterstützt die Annahme eines effizienteren G2/M-Checkpoints nach MMS. Eine Aufhebung dieses Checkpoints mittels Koffein führte im Gegensatz zu spontanen Schäden in unbehandelten Zellen zu einer Zunahme MMS-induzierter γ H2AX-Foci. Während diese in HSF1-Zellen relativ schwach ausgeprägt war (etwa 3 – 4 zusätzliche γ H2AX-Foci), wurde in HSC62 eine stark erhöhte γ H2AX-Zahl nach Koffein-Zugabe detektiert. Diese wiesen durchschnittlich etwa 14 γ H2AX-Foci mehr auf als ohne Koffein-Zugabe und es wurden z.T. Mitosen mit mehr als 30 γ H2AX-Foci gefunden (Abb.4.16.A). Nach der künstlichen Aufhebung des G2/M-Checkpoints mittels Koffein hatten somit vor allem HSC62-Zellen die Zellteilung mit einem erhöhten Schadens-Niveau eingeleitet. Für die ebenfalls ausgewerteten frühen G1-Zellen ergab sich ein ähnliches Bild wie in mitotischen Zellen. Das γ H2AX-Level lag hier bei allen

Ansätzen deutlich niedriger als in Mitosen, was auf eine Verteilung der γ H2AX-Foci auf die beiden entstandenen Tochterzellen zurückgeführt werden kann. Der Einfluss der unterschiedlichen Behandlungen zeigte sich aber genauso deutlich wie in der Mitose. So zeigten bestrahlte Zellen die höchste Zahl an γ H2AX-Foci in der G1-Phase, wohingegen nach einer MMS-Behandlung lediglich ein leicht erhöhtes γ H2AX-Niveau in HSC62 oder in Koffein-behandelten Zellen detektiert wurde (Abb.4.16.C). Der nach Bestrahlung ineffiziente aber nach MMS effektive G2/M-Checkpoint konnte somit anhand persistierender γ H2AX-Foci auch noch in der nächsten G1-Phase nachgewiesen werden.

Zusammenfassend geben die erhaltenen Daten deutliche Hinweise für einen effektiveren Zellzyklus-Arrest nach MMS-Behandlung als nach einer Bestrahlung in der G2-Phase. So scheinen Zellen die Mitose erst dann einzuleiten, wenn fast alle MMS-induzierten und durch γ H2AX-Foci gekennzeichneten Replikations-Schäden behoben sind. Diese Beobachtungen sind konsistent mit dem lang anhaltenden Zellzyklus-Arrest, der bereits in den durchfluss-zytometrischen Untersuchungen nach MMS detektiert wurde (Abb.4.7, Abb.4.12).

4.5.2 Analyse MMS-induzierter γ H2AX-Foci in praemitotischen Zellzyklus-Stadien

Die Analyse von γ H2AX-Foci in mitotischen Zellen zeigte interessante Unterschiede der zellulären Zellzykluskontroll-Mechanismen nach Bestrahlung und nach einer MMS-Behandlung auf. Nach einer Bestrahlung in der G2-Phase gehen die Zellen mit einer signifikanten Zahl noch unreparierter DSBs in die Mitose über. Nach einer MMS-Behandlung scheinen WT-Zellen die Mitose dagegen erst dann einzuleiten, wenn alle durch MMS erzeugten Replikations-Schäden repariert wurden. Dies wird umso deutlicher, wenn man das Foci-Level in der Mitose mit dem in der Spät-S-/G2-Phase vergleicht. Hier wurde in HSF1 nach einer Reparaturzeit von 16 h noch ein durchschnittlicher γ H2AX-Wert von etwa 30 Foci pro Zelle ermittelt (Abb.4.11). Dass eine Aufheben des G2/M-Checkpoints in diesen Wildtyp-Zellen durch Koffein-Zugabe dennoch nur zu einer moderaten Zunahme an mitotischen γ H2AX-Foci führt, könnte ein Zeichen dafür sein, dass sich die MMS-behandelten, EdU-markierten Zellen noch mehrheitlich in einem Stadium befinden, in dem ein Übergang in die Mitose selbst bei deaktivierten Checkpoint-Signalen noch nicht möglich ist. So wäre es denkbar, dass die Mehrheit der Zellen durch die noch nicht reparierten Replikations-Schäden noch in einem sehr späten Stadium der S-Phase arretiert ist. Ein Übertritt in die G2-Phase und anschließend in die Mitose wäre dann erst möglich, wenn diese Schäden zumindest weitgehend repariert wurden.

Eine sichere Unterscheidung zwischen einem späten Stadium der S-Phase und der G2-Phase ist in der Immunfluoreszenz sehr schwierig. So gibt es zwar spezifische G2-Marker (z. B. CENP-F), allerdings werden diese in der Regel schon zum Ende der S-Phase hin exprimiert, was eine sichere Abgrenzung von S- und G2-Phase nicht möglich macht. Im fol-

genden Versuch wurde daher ein neuer Ansatz gewählt, bei dem die EdU-markierten Zellen anhand des pH3-Signals klassifiziert wurden. Die phosphorylierte Form des Histons H3 gilt als ein Marker für die Mitose (Prigent + Dimitrov 2003) und so wurde die stärkste pH3-Intensität in mitotischen Zellen gemessen. Dennoch wurde auch in Zellen vor der Mitose eine unterschiedlich starke pH3-Färbung beobachtet. Anhand der Stärke und der Morphologie dieses pH3-Signals wurden die EdU-markierten Zellen in vier Kategorien eingeteilt, die in Abb.4.17.A dargestellt sind. Die Zellen, die noch keine signifikante H3-Phosphorylierung aufwiesen, wurden in Kategorie 1 eingeordnet, wohingegen die Zellen, in denen schon eine beginnende Ausbildung des pH3-Signals detektiert wurde, Kategorie 2 zugeteilt wurden. Mit zunehmender H3-Phosphorylierung stieg nicht nur die pH3-Intensität an, es wurde auch eine Veränderung in der Morphologie des Signals beobachtet, das nun nicht mehr rein flächig verteilt war. Stattdessen wurden einzelne, distinkte Areale mit einer besonders starken pH3-Intensität detektiert, die als Kriterium für eine Einordnung von Zellen zu pH3-Kategorie 3 herangezogen wurden. In Kategorie 4 wurden schließlich die Zellen eingeordnet, deren pH3-Signal bereits fast so stark war wie in der Mitose (Abb.4.17.A). Mitotische Zellen wurden aufgrund der im DAPI-Signal erkennbaren Kondensation der DNA identifiziert und aus der Auswertung ausgeschlossen. Geht man nun davon aus, dass die Phosphorylierung des Histons H3 zur Mitose hin zunimmt, sollte man anhand des ansteigenden pH3-Signals von Kategorie 1 – 4 eine Progression der Zelle in Richtung Mitose ablesen können. Durch die Bestimmung der Anzahl an γ H2AX-Foci für diese vier pH3-Kategorien sollte nun überprüft werden, ob eine Korrelation zwischen dem MMS-induzierten Schadens-Level und der Progression der Zellen besteht. Dazu wurden HSF1- und HSC62-Zellen für 1 h mit EdU und 1,5 bzw. 0 mM MMS behandelt. Die Fixierung der Zellen und die Immunfluoreszenzfärbung gegen EdU, γ H2AX und pH3 erfolgten nach 5 h (bei 0 mM MMS) bzw. 16 h (bei 1,5 mM MMS). Anschließend wurde für jede pH3-Kategorie die Anzahl an γ H2AX-Foci in je 40 Zellen ermittelt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb.4.17.B aufgetragen.

Die Analyse von γ H2AX-Foci in den unterschiedlichen pH3-Kategorien ergab eine eindeutige Korrelation zwischen dem MMS-induzierten Schadens-Level und dem pH3-Signal der untersuchten Zellen. In HSF1 sank die Anzahl MMS-induzierter γ H2AX-Foci kontinuierlich mit steigendem pH3-Signal und der dadurch gekennzeichneten weiteren Progression der Zellen im Zellzyklus (Abb.4.17.B). Auch bei der Entwicklung des spontanen γ H2AX-Niveaus in unbehandelten Zellen konnte ein kontinuierlicher Rückgang der γ H2AX-Zahl in Richtung Mitose beobachten werden. Mit steigender pH3-Kategorie näherte sich die Anzahl MMS-induzierter γ H2AX-Foci immer stärker dem spontanen γ H2AX-Level an. Die Zellen, die der pH3-Kategorie 4 zugeordnet wurden, stellen die Subpopulation der Zellen da, welche kurz vor dem Übertritt in die Mitose stehen. Diese Zellen zeigten nach einer MMS-Behandlung ein kaum noch erhöhtes Foci-Niveau im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dies ist ein starkes Zeichen dafür, dass eine weitgehende Reparatur der MMS-induzierten Replikations-Schäden

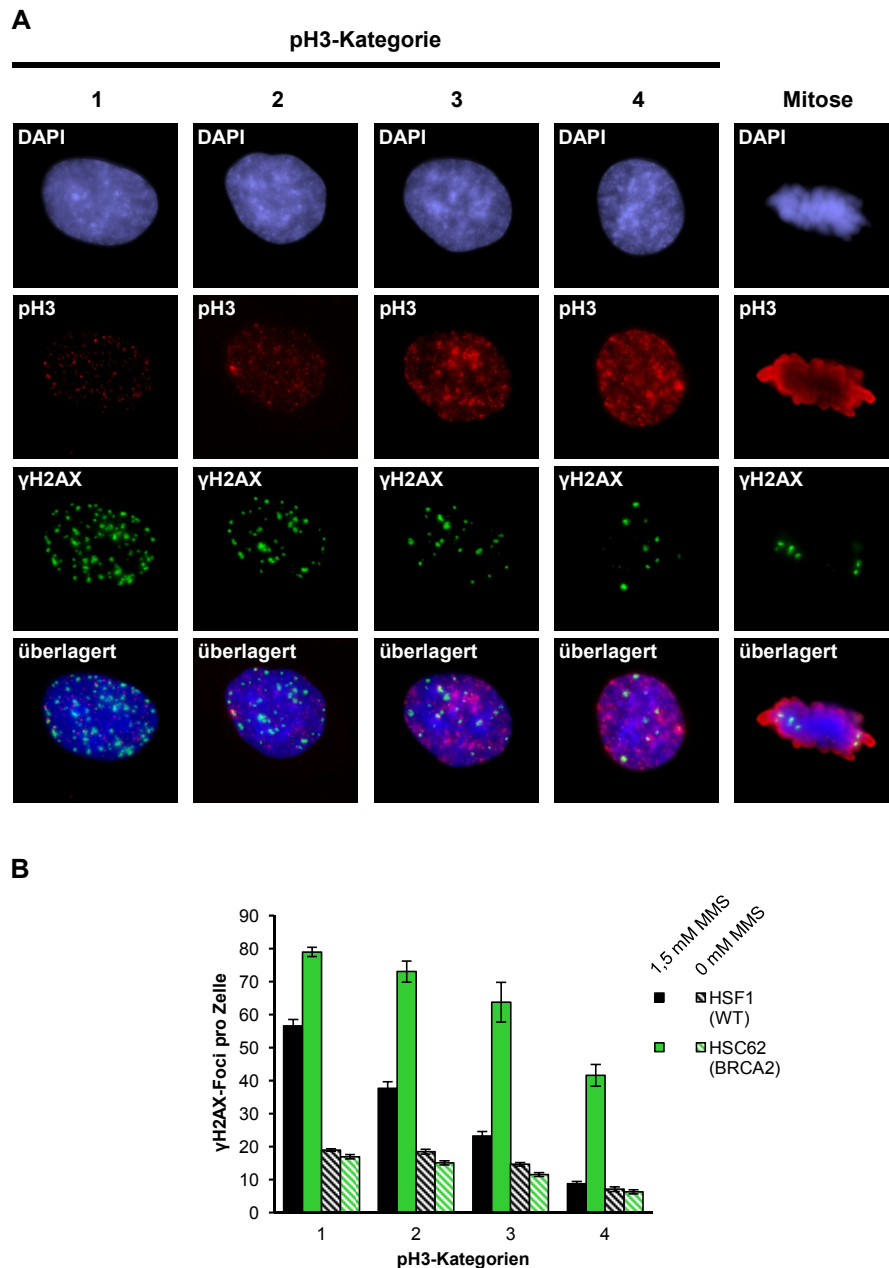


Abb.4.17: Korrelation MMS-induzierter γ H2AX-Foci mit dem pH3-Signal in praemitotischen Zellzyklus-Phasen

HSF1- und HSC62-Zellen wurden für 1 h mit 10 μ M EdU und 0 bzw. 1,5 mM MMS behandelt, nach 5 bzw. 16 h fixiert und anschließend immunfluoreszenztechnisch gegen EdU, γ H2AX und pH3 gefärbt. Anhand der Stärke und der Morphologie des pH3-Signals wurden die EdU-markierten Zellen in vier pH3-Kategorien eingeteilt und die Anzahl an γ H2AX-Foci wurde für jede dieser Kategorien in je 40 Zellen bestimmt. **(A)** Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen MMS-induzierter γ H2AX-Foci in den vier pH3-Kategorien EdU-positiver HSF1-Zellen, aufgenommen bei 1000facher Vergrößerung. Dargestellt sind die vier pH3-Kategorien mit ansteigender pH3-Intensität sowie eine Zelle in der Mitose. Mitotische Zellen gingen nicht in die Auswertung ein. Das EdU-Signal der Zellen ist nicht dargestellt. **(B)** Anzahl spontaner und MMS-induzierter γ H2AX-Foci in den pH3-Kategorien von HSF1 und HSC62. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus 3 – 4 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an.

tatsächlich die Voraussetzung für das Erreichen dieses späten Stadiums der G2-Phase darstellt. Zudem ist die Beobachtung konsistent mit dem Ergebnis, dass auch in mitotischen HSF1-Zellen fast keine MMS-induzierten γ H2AX-Foci nachzuweisen sind (Abb.4.16.B). BRCA2-defiziente HSC62-Zellen zeigten mit steigendem pH3-Signal ebenfalls eine Abnahme an γ H2AX-Foci. Konsistent mit dem zuvor beschriebenen Reparaturdefekt dieser Zelllinie nach MMS war diese γ H2AX-Abnahme aber deutlich schwächer ausgeprägt als im Wildtyp (Abb.4.17.B). Trotz der verminderten Reparaturkapazität konnten für HSC62 auch Zellen gefunden werden, die in pH3-Kategorie 4 eingeordnet wurden. Im Vergleich zu HSF1 zeigten diese Zellen aber ein deutlich erhöhtes γ H2AX-Niveau. Somit konnten HSC62 trotz des hohen Schadens-Levels ein Zellzyklus-Stadium kurz vor der Mitose erreichen, was zumindest in dieser Zelllinie gegen die Theorie spricht, dass die MMS-induzierten Replikations-Schäden eine Progression der Zellen in dieses Stadium verhindern. Diese hohe Anzahl an γ H2AX-Foci vor der Mitose stellt aber eine Erklärung für die Beobachtung dar, dass das mitotische γ H2AX-Level in HSC62 durch eine Aufhebung des G2/M-Checkpoints mittels Koffein stark ansteigt (Abb.4.16.B).

Durch die Analyse von MMS-induzierten γ H2AX-Foci in mitotischen Zellen und in praemitotischen Zellzyklus-Stadien vor der Zellteilung konnten neue Einblicke bezüglich des Zusammenspiels von DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle nach einer Behandlung mit MMS gewonnen werden. Mit einer fortschreitenden Progression der MMS-behandelten Zellen im Zellzyklus nimmt die Menge an MMS-induzierten γ H2AX-Foci ab, was einen Hinweis auf eine gegenseitige Beeinflussung von DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle darstellen könnte. Die Mitose wird zumindest in Wildtyp-Zellen erst zu einem Zeitpunkt eingeleitet, wenn die MMS-induzierten Replikations-Schäden weitgehend repariert wurden. Ob diese Beobachtung auf einen sehr effektiven G2/M-Checkpoint nach MMS oder aber auf eine durch die MMS-Schäden verhinderte Progression der Zellen in die G2-Phase zurückzuführen ist, kann momentan noch nicht beurteilt werden.

4.6 Unterschiede in den beteiligten Reparatur-Faktoren an den HR-Prozessen in der S- und der G2-Phase

Die erstellten γ H2AX-Reparatukinetiken nach Behandlung von Fibroblasten- oder CHO-Linien mit 1,5 mM MMS verdeutlichten eine Determinierung der MMS-induzierten Replikations-Schäden für den Reparaturprozess der HR, wohingegen der NHEJ-Weg nicht zur Reparatur dieser Schäden beiträgt. Neben MMS gibt es eine Vielzahl weiterer Agenzien wie CPT, HU oder PARP-Inhibitoren, welche die Replikation stören und zur Ausbildung Replikations-assoziiierter DNA-Schäden führen können. Auch bei der Reparatur der durch diese Agenzien induzierten Schäden wird der HR eine entscheidende Rolle zugeschrieben

(Helleday et al. 2008). Die HR ist allerdings nicht nur auf die Reparatur solcher Replikations-assoziiierter DNA-Schäden beschränkt. Auch eine Subpopulation (etwa 15 – 20 %) an strahleninduzierten DSBs in der G2-Phase wird über den HR-Prozess repariert. Bei diesen HR-abhängigen Schäden in G2 handelt es sich um DSBs, welche im heterochromatischen Bereichen des Genoms erzeugt wurden (Beucher et al. 2009). Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit sollte dieser heterochromatische Subweg der HR in der G2-Phase mit den HR-Prozessen an den Replikations-assoziierten Schäden nach MMS verglichen werden. Dabei sollte die Beteiligung unterschiedlicher Reparatur-Faktoren an diesen beiden HR-Wegen beurteilt werden.

4.6.1 Untersuchung der Beteiligung von ATM, ATR und Artemis an den HR-Prozessen nach MMS und nach Bestrahlung in der G2-Phase

Durch eingehende Untersuchungen der genetischen Voraussetzungen des heterochromatischen HR-Wegs in der G2-Phase konnten neben klassischen HR-Faktoren weitere Proteine identifiziert werden, die an diesem Reparaturprozess beteiligt sind. So bilden beispielsweise Zellen mit einer ATM- oder einer Artemis-Defizienz den gleichen Reparaturdefekt nach einer Bestrahlung in der G2-Phase aus wie BRCA2-defiziente Zellen (Beucher et al. 2009). Durch den Vergleich des Reparaturverhaltens nach MMS-Behandlung und nach Bestrahlung in der G2-Phase sollte im Folgenden untersucht werden, ob diese für den heterochromatischen HR-Weg in der G2-Phase beschriebenen Faktoren auch an den Reparaturprozessen nach MMS in der S-Phase beteiligt sind. Dadurch sollte beurteilt werden, ob Proteine wie ATM und Artemis als generelle HR-Faktoren zu bewerten sind oder ob sie lediglich spezifische Funktionen im Heterochromatin übernehmen. Dazu wurden γ H2AX- und Rad51-Reparaturkinetiken in humanen Fibroblasten mit einer Defizienz für ATM (AT1BR) oder für Artemis (CJ179) nach einer Behandlung mit 1,5 mM MMS erstellt. Zusätzlich wurden F02-98 hTert-Zellen untersucht, die eine reduzierte ATR-Aktivität aufweisen. ATR wird eine entscheidende Rolle in der Koordination von DNA-Reparaturprozessen und Zellzykluskontrolle vor allem in der S-Phase zugeschrieben (Shechter et al. 2004b). Daher sollte auch eine Beteiligung dieses Proteins an der Reparatur MMS-induzierter Replikations-Schäden untersucht werden.

Die unterschiedlichen Zelllinien wurden nun im exponentiellen Wachstum für 1 h mit 10 μ M BrdU bzw. EdU und 1,5 bzw. 0 mM MMS behandelt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten wurden die Zellen fixiert und einer kombinierten γ H2AX/BrdU- bzw. Rad51/EdU-Doppel-färbung unterzogen. In den BrdU- oder EdU-markierten Zellen wurde dann der Anteil an γ H2AX- und Rad51-Foci bestimmt und mit den zuvor ermittelten Werten in HSF1-Zellen (WT) verglichen (Abb.4.18.A+B). Um eventuelle Unterschiede zur Reparatur heterochromatischer DSBs in der G2-Phase nachvollziehen zu können, wurde in diesen Zellen sowie in BRCA2-defizienten HSC62-Zellen auch das Reparaturverhalten nach einer Bestrahlung in

der G2-Phase analysiert. Dazu wurden die Zellen für 1 h mit 10 μ M EdU markiert und anschließend mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt. Direkt vor der Bestrahlung wurde den Zellen 3 μ g/ml Aphidicolin zugegeben um replizierende Zellen in der S-Phase zu arretieren. Dadurch wurde es möglich, auch über einen längeren Zeitraum eine reine G2-Population zu untersuchen. Anhand von früheren Studien innerhalb der Arbeitsgruppe wurden entscheidende Reparatur-Zeitpunkte für die Prozesse der Ausbildung und Reparatur der Foci gewählt. So wurde beispielsweise die Ausbildung an Rad51-Foci 2 h nach der Bestrahlung untersucht, da zu diesem Zeitpunkt das Maximum an Rad51-Foci nach 2 Gy erreicht wird und Resektions-Defekte am deutlichsten ausgeprägt sind (Beucher et al. 2009). Nach der Fixierung der Zellen wurden sie in der Immunfluoreszenz gegen EdU und γ H2AX bzw. Rad51 gefärbt und die Anzahl an γ H2AX- oder Rad51-Foci wurde in EdU-negativen G2-Zellen bestimmt (Abb.4.18.C+D).

Für die beiden Proteine ATM und Artemis wurde eine unterschiedliche Bedeutung in den HR-Prozessen nach MMS und nach einer Bestrahlung in der G2-Phase beobachtet. AT1BR- und CJ179-Zellen wiesen nach Bestrahlung in G2 einen γ H2AX-Reparaturdefekt in der langsamen Reparatur-Komponente auf, der vergleichbar stark ausgeprägt war wie der Defekt in BRCA2-defizienten HSC62-Zellen (Abb.4.18.C). Dieses im Vergleich zu WT-Zellen erhöhte Restschaden-Level repräsentiert den Anteil strahleninduzierter DSBs im Heterochromatin, deren Reparatur abhängig von ATM und Artemis erfolgt (Beucher et al. 2009). Im Gegensatz dazu scheinen ATM und Artemis keine Funktion bei der Reparatur MMS-induzierter Schäden zu haben. Die γ H2AX-Kinetiken in ATM- bzw. Artemis-defizienten Zellen zeigten einen vergleichbaren Verlauf wie die in HSF1 beobachtete Kinetik, ein Reparaturdefekt war für beide Zelllinien nicht zu erkennen (Abb.4.18.A). Diese uneingeschränkte Reparatur-Kapazität ATM- und Artemis-defizienter Zellen nach MMS wurde auch durch die erhaltenen Rad51-Kinetiken bestätigt. Auch hier wurden kaum Unterschiede in den Kinetiken von HSF1 (WT), AT1BR (ATM) und CJ179 (Artemis) detektiert (Abb.4.18.B). Im Gegensatz dazu zeigten CJ179 und vor allem AT1BR einen deutlichen Defekt in der Ausbildung von Rad51-Foci nach Bestrahlung in der G2-Phase. Zu einem Zeitpunkt von 2 h nach der Bestrahlung wurde im Wildtyp das Maximum an Rad51-Foci beobachtet. In BRCA2- und ATM-defiziente Zellen traten dagegen kaum Rad51-Foci auf und auch in Artemis-Zellen war die Rad51-Zahl im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert (Abb.4.18.D). ATM und Artemis sind somit nicht als generelle HR-Faktoren zu bewerten, sondern übernehmen lediglich spezifische Funktionen in dem für heterochromatische DSBs spezialisierten HR-Prozess in der G2-Phase.

Der Kinase ATR werden wichtige Funktionen während der S-Phase zugeschrieben, eine essentielle Beteiligung an der Reparatur MMS-induzierter Schäden konnte allerdings nicht beobachtet werden. Sowohl auf γ H2AX- als auch auf Rad51-Ebene wurden keine großen Unterschiede zwischen ATR-defizienten F02-98 hTert und HSF1 (WT) detektiert. Zwar stieg die γ H2AX-Kinetik in F02-98 hTert insgesamt weniger stark an, ein Reparaturdefekt trat aber

nicht auf (Abb.4.18.A+B). Nach Bestrahlung in der G2-Phase wurde in dieser Zelllinie bei allen Zeitpunkten eine sehr ähnliche Anzahl γ H2AX- und Rad51-Foci ermittelt wie in Wildtyp-Zellen (Abb.4.18.C+D). ATR scheint somit weder an den HR-Prozessen an der Replikationsgabel nach MMS noch am Heterochromatin-spezifischen HR-Weg in der G2-Phase beteiligt zu sein.

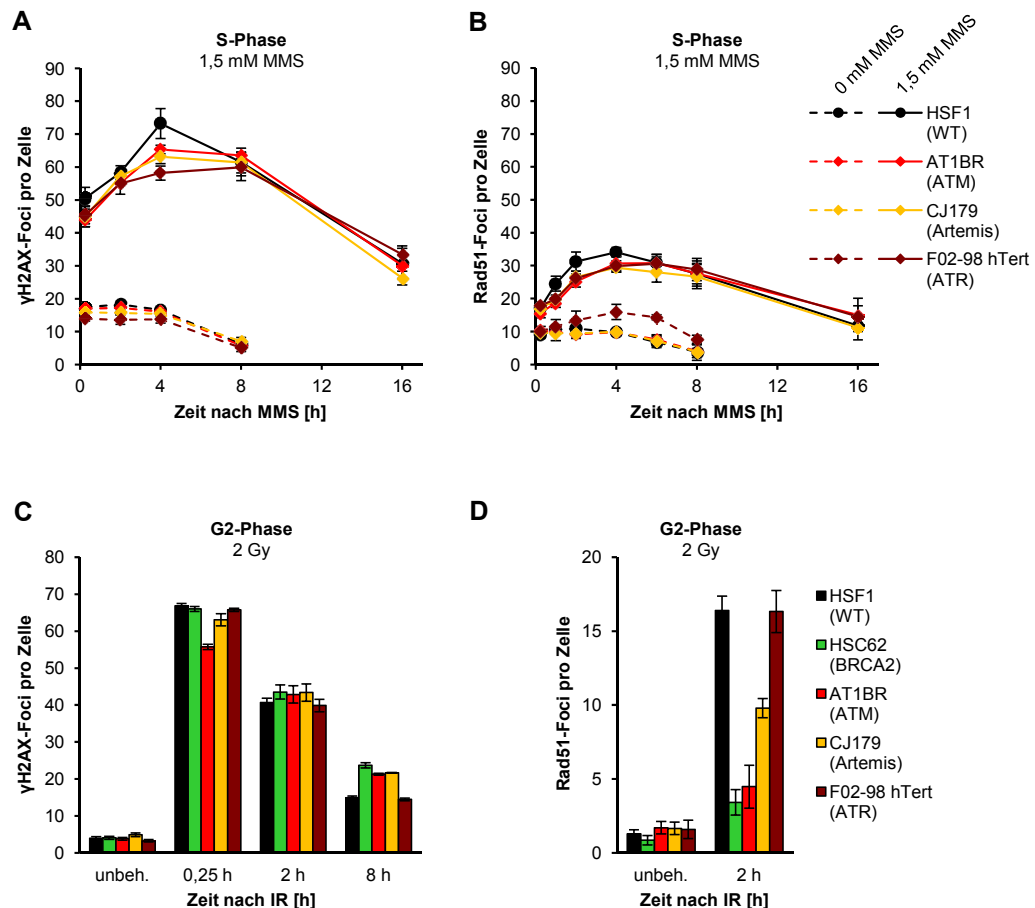


Abb.4.18: γ H2AX- und Rad51-Kinetiken unterschiedlicher Reparaturmutanten nach 1,5 mM MMS in der S-Phase oder Bestrahlung mit 2 Gy in der G2-Phase

(A+B) γ H2AX- und Rad51-Reparaturkinetiken nach 1,5 mM MMS in der S-Phase. Exponentiell wachsende, humane Fibroblasten mit einer Defizienz für ATM (AT1BR), Artemis (CJ179) oder ATR (F02-98 hTert) wurden für 1 h mit 10 μ M BrdU bzw. EdU und 1,5 mM MMS behandelt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten (15 min – 16 h) wurden die Zellen fixiert und einer kombinierten γ H2AX/BrdU- oder Rad51/EdU-Doppelfärbung unterzogen. In je 40 BrdU- bzw. EdU-positiven Zellen wurde die Anzahl an γ H2AX- (A) bzw. Rad51-Foci (B) ermittelt und mit den Werten in WT-Zellen (HSF1) verglichen (Daten aus Abb.4.5 übernommen). Ebenfalls dargestellt sind die γ H2AX- und Rad51-Kinetiken unbehandelter Zellen. (C+D) γ H2AX- und Rad51-Reparaturpunkte nach 2 Gy in der G2-Phase. Die zuvor beschriebenen Zelllinien sowie HSF1 (WT) und HSC62 (BRCA2-defizient) wurden im exponentiellen Wachstum für 1 h mit 10 μ M EdU markiert und anschließend mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt. Direkt vor dieser Bestrahlung wurde den Zellen 3 μ g/ml Aphidicolin zugegeben. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten (15 min – 8 h) wurden die Zellen fixiert und immunfluoreszenztechnisch gegen EdU und γ H2AX bzw. Rad51 gefärbt. In je 40 EdU-negativen G2-Zellen wurde die Anzahl an γ H2AX- (C) bzw. Rad51-Foci (D) bestimmt. Die Datenpunkte aller Graphiken repräsentieren die Mittelwerte aus 3 - 4 unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an.

4.6.2 Untersuchung des Einflusses von ATM, ATR und Artemis auf das Zellzyklusverhalten nach MMS

Die Kinasen ATR und ATM sind zentrale Knotenpunkte des Signalnetzwerks zur Koordination der Prozesse von DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle (Segupta + Harris 2005). So phosphorylieren sie beispielsweise die Checkpoint-Kinasen Chk1 und Chk2, was eine entscheidende Reaktion für die Einleitung und die Aufrechterhaltung von Checkpoints darstellt. Darüber hinaus sind sie für die Aktivierung und Rekrutierung einer Vielzahl von Reparaturfaktoren verantwortlich. Eine direkte Beteiligung der beiden Proteine an der Reparatur MMS-induzierter Replikations-Schäden konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Jedoch wäre es möglich, dass ATM und ATR wichtige Funktion in der Zellzykluskontrolle nach einer MMS-Behandlung haben. Um diese Theorie zu untersuchen wurde das Zellzyklusverhalten ATM- und ATR-defizienter Zellen nach einer Behandlung mit 1,5 mM MMS analysiert.

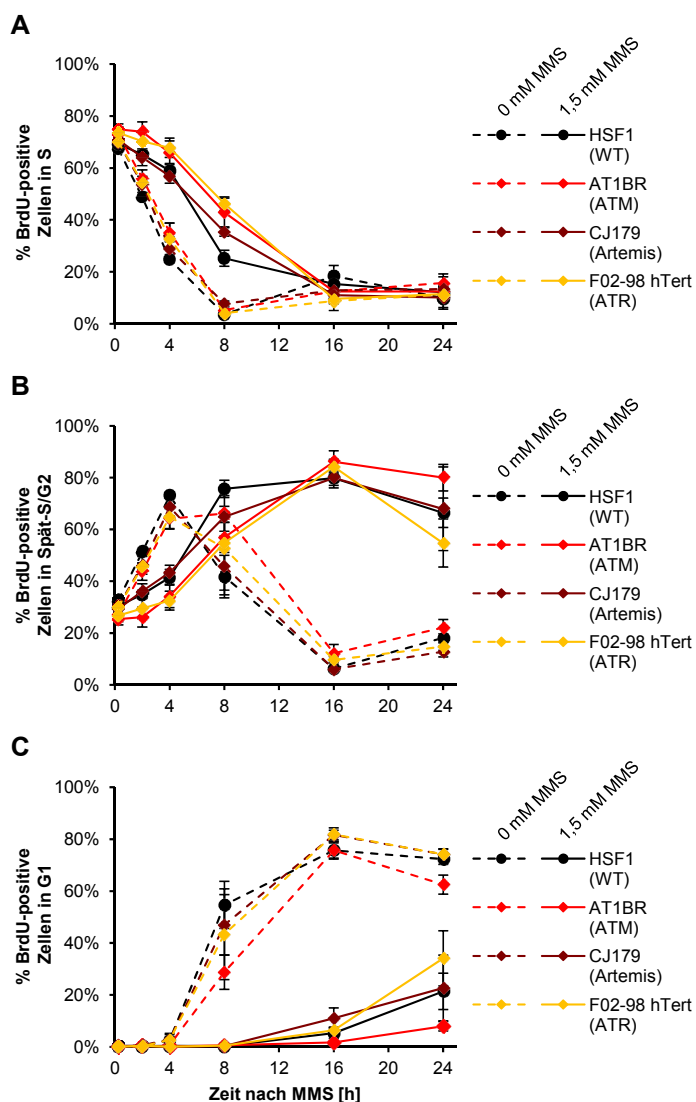


Abb.4.19: Zellzyklusverhalten von HSF1-, AT1BR-, CJ179- und F02-98 hTert-Zellen nach 1,5 mM MMS

AT1BR-, CJ179- sowie F02-98 hTert-Zellen wurden im exponentiellen Wachstum für 1 h mit 10 μ M BrdU und 1,5 mM bzw. 0 mM MMS behandelt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten (15 min – 24 h) wurden die Zellen fixiert und einer 2-dimensionalen FACS-Färbung gegen BrdU und PI unterzogen. Im Durchflusszytometer wurde die Zellzyklusverteilung der einzelnen Proben bestimmt, wobei pro Messpunkt 15000 – 20000 Zellen analysiert wurden. Die Untersuchung der Zellzyklus-Progression wurde begrenzt auf die BrdU-markierten Zellen. Bezogen auf diese Population wurde der Anteil BrdU-positiver Zellen in der S-Phase (**A**), der Spät-S/G2-Phase (**B**) und der G1-Phase (**C**) ermittelt und getrennt dargestellt. Die Datenpunkte spiegeln die Mittelwerte aus 3 – 4 unabhängigen Experimenten wider, die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte. Die Daten für HSF1-Zellen wurden aus Abb.4.7 übernommen.

Dazu wurden exponentiell wachsenden AT1BR- und F02-98 hTert-Zellen sowie die Artemis-defizienten CJ179-Zellen für 1 h mit 10 μ M BrdU und 1,5 bzw 0 mM MMS behandelt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten wurden die Zellen fixiert und einer 2-dimensionalen BrdU/PI-FACS-Färbung unterzogen. Im Durchflusszytometer wurde dann das Zellzyklusverhalten der BrdU-markierten Zellen untersucht und mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen in HSF1-Zellen (siehe Abb.4.7) verglichen. Das ermittelte Zellzyklusverhalten ist in Abb.4.19 graphisch dargestellt.

ATM- und ATR-defiziente Zellen zeigten unbehandelt und nach 1,5 mM MMS ein weitgehend vergleichbares Zellzyklusverhalten wie Wildtyp- und Artemis-defiziente Zellen (Abb.4.19). Sowohl die durch MMS verursachte, verlangsamte Progression durch die S-Phase als auch der lang anhaltende G2/M-Checkpoint waren in den ATM- oder ATR-defizienten Zellen deutlich zu erkennen. Die AT-Zellen zeigten zwar generell eine leicht langsamere Zellzyklus-Progression als die übrigen Zelllinien, dennoch konnten keine Defekte in der Einleitung oder Aufrechterhaltung des MMS-induzierten Zellzyklus-Arrests detektiert werden (Abb.4.19).

Eine Defizienz von ATM oder ATR hatte somit kaum Einfluss auf die Zellzykluskontroll-Mechanismen nach einer MMS-Behandlung. Dies könnte zum einen auf eine Redundanz von ATM und ATR oder aber auf ATM- und ATR-unabhängige Zellzyklus-Prozesse zurückzuführen sein.

4.6.3 Untersuchung der Beteiligung der Mediatorproteine 53BP1 und MDC1 an den HR-Prozessen nach MMS und nach Bestrahlung in der G2-Phase

Anhand der Reparaturstudien in MMS-behandelten AT-Zellen konnte eine Beteiligung von ATM an der Reparatur MMS-induzierter Replikations-Schäden ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu ist ATM aber ein essentieller Faktor für die HR-abhängige Reparatur von Heterochromatin-assoziierten DSBs in der G2-Phase (vergl. Abb.4.18). Eine Funktion von ATM im Heterochromatin besteht dabei in der Phosphorylierung des Heterochromatin-Bildungsfaktor KAP-1. Diese Phosphorylierung führt zu einer lokalen Öffnung dieser hochkonzentrierten Chromatin-Struktur, wodurch eine Reparatur des DSBs ermöglicht wird (Goodarzi et al. 2008, Goodarzi et al. 2010). Die uneingeschränkte Reparatur-Kapazität von AT-Zellen nach MMS könnte daher darauf zurückzuführen sein, dass das Chromatin an einer Replikationsgabel bereits in einer entspannten Form vorliegt und eine ATM-vermittelte Phosphorylierung von KAP-1 für eine Reparatur des MMS-induzierten Replikations-Schadens nicht nötig ist.

Zur Überprüfung dieser Theorie wurde die Bedeutung der Mediatorproteine MDC1 und 53BP1 nach MMS bestimmt. In früheren Studien wurde gezeigt, dass MDC1 und 53BP1 wie ATM wichtige Funktionen bei der lokalen Entspannung heterochromatischer Bereiche besitzen und somit wichtig für eine Reparatur von DSBs in diesen Regionen sind (Noon et al.

2010). Durch den Vergleich des Reparaturverhaltens MDC1- und 53BP1-depletierter Zellen nach MMS und nach Bestrahlung in der G2-Phase sollte untersucht werden, ob ähnlich wie für ATM und Artemis auch die Funktion der beiden Mediator-Proteine auf den heterochromatischen Subweg der HR begrenzt ist. Dazu wurden A549-Zellen direkt nach der Aussaat mit spezifischen siRNAs gegen MDC1 bzw. 53BP1 transfiziert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit einer Kontroll-siRNA ohne genomische Zielsequenz transfiziert. Eine effiziente Depletion der beiden Mediatorproteine wurde 72 h nach der Aussaat beobachtet, zu diesem Zeitpunkt erfolgte die weitere Versuchsdurchführung. Zur Untersuchung des Reparaturverhaltens für MMS-induzierte Schäden, wurden die Zellen für 1 h mit 10 μ M EdU und 1,5 mM MMS behandelt. Für die Analyse der Reparatur strahleninduzierter Schäden wurden die Zellen nach der EdU-Markierung mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt. Analog zu den zuvor durchgeführten Reparaturstudien nach Bestrahlung in der G2-Phase wurde den Zellen direkt vor der Bestrahlung Aphidicolin (3 μ g/ml) zugegeben. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten wurden die Zellen fixiert und anschließend einer kombinierten Immunfärbung gegen EdU, 53BP1 und γ H2AX unterzogen. Anhand der Färbung von 53BP1-Foci wurde es in der Immunfluoreszenz möglich die Zellen mit einer effizienten Depletion der Mediator-Proteine zu identifizieren, denn sowohl eine Defizienz von 53BP1 als auch von MDC1 resultiert in einer defekten Ausbildung von 53BP1-Foci (Xie et al. 2007, Noon et al. 2010). In den Ansätzen mit siRNAs gegen 53BP1 oder MDC1 wurde die Anzahl an γ H2AX-Foci daher nur in Zellen ohne 53BP1-Foci ausgewertet.

Da die Mediatorproteine Teil des ATM-abhängigen Signalwegs zur Öffnung des Heterochromatins sind (Jungmichel + Stucki 2010), wurde erwartet, dass sie nach Bestrahlung in der G2-Phase einen ähnlichen Reparaturdefekt ausbilden wie ATM-defiziente Zellen. Um diese Epistasie zwischen ATM und den Mediatoren zu überprüfen, wurde die γ H2AX-Zahl in einem Ansatz bestimmt, in dem die Zellen ab einem Zeitpunkt von 1 h vor der Bestrahlung zusätzlich mit einem spezifischen ATM-Inhibitor behandelt wurden.

Nach einer Depletion von MDC1 oder 53BP1 wurde nach Bestrahlung in der G2-Phase ein γ H2AX-Reparaturdefekt detektiert, welcher sich erst zu einem späten Zeitpunkt von 8 h nach der Bestrahlung manifestierte. Im Gegensatz zum Ansatz mit Kontroll-siRNA führte eine zusätzliche Inhibition von ATM nach 53BP1- oder MDC1-siRNA zu keiner Zunahme der γ H2AX-Zahl zu diesem Zeitpunkt (Abb.4.20.B). MDC1 und 53BP1 verhielten sich somit epistatisch zu ATM, was für eine Beteiligung der beiden Mediatorproteine am ATM-abhängigen HR-Vorgang in der G2-Phase spricht. Im Gegensatz zur Situation nach Bestrahlung in der G2-Phase konnte für 53BP1 keine Beteiligung an der Reparatur MMS-induzierter Replikations-Schäden beobachtet werden. Über den gesamten Untersuchungs-Zeitraum wurden in 53BP1-depletierten Zellen vergleichbare γ H2AX-Werte ermittelt wie in Zellen mit Kontroll-siRNA (Abb.4.20.A). Dagegen zeigten die Kinetiken in MDC1-depletierten Zellen einen etwas anderen Verlauf. Die Ausbildung von γ H2AX-Foci war in diesen Zellen innerhalb der ersten 4 h nach der MMS-Behandlung etwas schwächer ausgeprägt als in den anderen

beiden Ansätzen, nach 20 h wurde dann aber eine deutliche Erhöhung der γ H2AX-Zahl detektiert. Dies deutet auf eine Funktion von MDC1 in der Reparatur MMS-induzierter Schäden hin, an der 53BP1 nicht beteiligt ist. Etwas überraschend war die Beobachtung, dass MDC1-depletierte Zellen ein etwas geringes γ H2AX-Level ausbildeten. Im Gegensatz zu Zellen mit Kontroll- oder 53BP1-siRNA zeigten MDC1-depletierte Zellen aber nur eine eingeschränkte H2AX-Phosphorylierung. Die γ H2AX-Foci in diesen Zellen waren deutlich schwächer und diffuser als in den anderen Ansätzen (Ergebnis nicht dargestellt). Das geringere γ H2AX-Level, das nach MDC1-siRNA detektiert wurde, scheint daher lediglich die Folge der erschwerten Auswertung dieser γ H2AX-Foci zu sein.

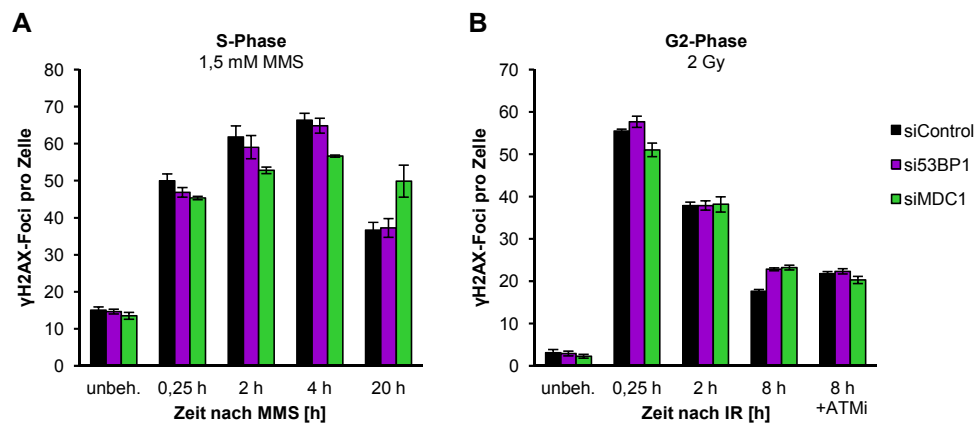


Abb.4.20: γ H2AX-Reparaturkinetiken 53BP1- und MDC1-depletierter A549-Zellen nach 1,5 mM MMS in der S-Phase oder Bestrahlung mit 2 Gy in der G2-Phase

(A) γ H2AX-Reparaturkinetiken nach 1,5 mM MMS in der S-Phase. A549-Zellen wurden direkt nach der Aussaat mit siRNAs gegen 53BP1 oder MDC1 bzw. mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 1 h mit 10 μ M EdU und 1,5 mM MMS behandelt und nach unterschiedlichen Reparaturzeiten fixiert. (B) γ H2AX-Reparaturkinetik nach 2 Gy in der G2-Phase. A549-Zellen wurden wie zuvor beschrieben mit den angegebenen siRNAs transfiziert und nach 72 h für 1 h mit 10 μ M EdU behandelt. Danach wurde den Proben 3 μ g/ml Aphidicolin zugegeben und die Zellen wurden mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten erfolgte die Fixierung. Zusätzlich wurde hier die Auswirkung einer ATM-Inhibition auf das Reparaturverhalten nach 8 h untersucht. Dazu wurde je 1 Ansatz während der gesamten Zeitspanne von der EdU-Zugabe bis zur Fixierung 8 h nach der Bestrahlung in Gegenwart eines spezifischen ATM-Inhibitors (10 μ M) kultiviert. Bei allen Ansätzen wurden die fixierten Zellen einer Dreifachfärbung gegen EdU, 53BP1 und γ H2AX unterzogen. Die Anzahl an γ H2AX-Foci wurde je nach Ansatz in 40 EdU-positiven S-Phase-Zellen (A) oder in 40 EdU-negativen G2-Zellen (B) bestimmt. Dabei gingen immer nur die Zellen in die Auswertung ein, bei denen aufgrund des Ausbleibens von 53BP1-Foci auf eine effiziente Depletion von 53BP1 bzw. MDC1 geschlossen werden konnte. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten nach MMS bzw. aus 4 – 5 unabhängigen Experimenten nach 2 Gy. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an.

Durch die durchgeführten Reparaturstudien nach einer Behandlung mit MMS und nach Bestrahlung in der G2-Phase konnten deutliche Unterschiede in den genetischen Voraussetzungen für die HR-Prozesse in der S- und der G2-Phase ermittelt werden. Während ein

klassischer HR-Faktor wie BRCA2 sowohl in S als auch in G2 essentiell für eine Reparatur von DNA-Schäden über den HR-Weg ist, gibt es einige Faktoren, die lediglich im heterochromatischen Sub-Weg der HR in der G2-Phase involviert sind. So wurde für ATM, Artemis und 53BP1 eine Beteiligung an diesem Weg nach Bestrahlung in der G2-Phase nachgewiesen, die Reparatur MMS-induzierter Replikations-Schäden erfolgte ohne diese Proteine aber uneingeschränkt. Diese Faktoren scheinen somit keine generelle Aufgabe während der HR zu haben sondern eine spezifische Funktion für die Reparatur heterochromatischer DSBs. Dagegen wurde für MDC1 neben einer Funktion in der G2-Phase auch eine Beteiligung an der Reparatur MMS-induzierter Schäden beobachtet. Somit scheint MDC1 eine globalere Funktion während der unterschiedlichen HR-Prozesse zuzukommen.

5 Diskussion

5.1 Etablierung einer S-Phase-spezifischen γ H2AX-Immunfluoreszenzanalyse zur Untersuchung MMS-induzierter DNA-Schäden

Alkylierende Substanzen wie MMS besitzen eine karcinogene Wirkung, werden zum Teil aber auch gezielt als Chemotherapeutika zur Behandlung verschiedener Tumore (z. B. maligne Gliome oder metastasierende, maligne Melanome) eingesetzt (Villano et al. 2009, Eggermont + Kirkwood 2004). Die DNA-schädigende Wirkung scheint dabei hauptsächlich auf Störungen der Replikation während der S-Phase zu beruhen. So zeigen stationäre G0/G1-Zellen eine geringere Zahl MMS-abhängiger Schadens-Ereignisse als proliferierende Zellen (Staszewski et al. 2008). Die meisten Publikationen, die sich mit Alkylanzien wie MMS beschäftigten, lassen aber keine Aussage darüber zu, in welcher Zellzyklus-Phase sich die schädigende Wirkung dieser Substanzen manifestiert. So wurden in den klassischen Studien hauptsächlich Überlebensexperimente durchgeführt, die lediglich eine Beurteilung auf Ebene der gesamten Zellpopulation erlauben. In den letzten Jahren wurde die Wirkung von MMS mit neueren experimentellen Ansätzen untersucht. So wurde beispielsweise eine MMS-abhängige Phosphorylierung der Histonvariante H2AX beschrieben (Pascucci et al. 2005, Zhou et al. 2006). Allerdings wurde auch in diesen Studien der unterschiedliche Beitrag der Zellzyklus-Phasen meist nicht berücksichtigt.

5.1.1 Methodischer Ansatz zu Analyse von γ H2AX-Foci in der S-Phase

In dieser Arbeit sollte daher eine Zellzyklus-spezifische Methode zur Analyse MMS-induzierter Schäden etabliert werden. Die Technik der γ H2AX-Immunfluoreszenz ist eine sehr sensitive Methode zur Messung von DSBs auf Einzelzell-Ebene und wurde in den letzten Jahren intensiv zur Untersuchung strahleninduzierter DSBs in der G1- und G2-Phase angewandt (Löbrich et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Technik auf die Analyse MMS-induzierter γ H2AX-Foci in der S-Phase ausgeweitet. Eine S-Phase-spezifische γ H2AX-Analyse wurde dabei durch eine Pulsbehandlung der Zellen mit den Thymidin-Analoga BrdU oder EdU möglich. Der Einsatz der Mikroskop-Software Metapher der Firma Metasystems ermöglichte zudem eine Analyse von Zellen in der G1- und G2-Phase (Abb.4.1).

In den letzten Jahren haben sich γ H2AX-Foci mehr und mehr als ein effizienter und sicherer Marker von DSBs in der G1- und G2-Phase etabliert. Zwar gab es Einwände, dass γ H2AX-Foci vielleicht auch an anderen DNA-Schäden auftreten könnten (z. B. SSBs), intensive Untersuchungen in den letzten Jahren konnten dieses Argument aber widerlegen. So konnte

zum Beispiel gezeigt werden, dass eine Behandlung mit 0,1 mM H₂O₂ zwar SSBs in großer Zahl erzeugt (gemessen mittels Comet-Assay), aber dennoch keine signifikante Zunahme an γ H2AX-Foci auftritt (Löbrich et al. 2010). Darüber hinaus korreliert das mittels γ H2AX-Foci gemessene Induktions- und Reparaturverhalten strahleninduzierter DSBs sehr gut mit den Ergebnissen, die mit rein physikalischen Methoden wie der Pulsfeld-Gelelektrophorese erhalten wurden (Riballo et al. 2004, Kühne et al. 2004).

Diese Ergebnisse sind auf die S-Phase aber nicht direkt übertragbar. Ein Problem liegt dabei in der Art der Ausbildung der γ H2AX-Foci. In der G1- und G2-Phase ist die Phosphorylierung von H2AX abhängig von ATM und der DNA-PK, also von zwei Kinasen, die spezifisch an DSBs binden. In der S-Phase ist aber zusätzlich die Kinase ATR aktiv, die nicht durch DSBs aktiviert wird sondern durch einzelsträngige DNA-Bereiche an Replikationsgabeln (Shechter et al. 2004b). Daher kann es während der S-Phase auch zu einer DSB-unabhängigen Phosphorylierung von H2AX durch ATR kommen. In der Tat zeigen S-Phase-Zellen auch ohne eine schädigende Behandlung eine flächige γ H2AX-Hintergrundfärbung, die von ATR abhängig ist (Löbrich et al. 2010). Diese kann auf Replikations-Arreste zurückgeführt werden, die an endogenen DNA-Schäden oder an DNA-Bereichen auftreten, die generell schwierig zu replizieren sind (Meister et al. 2007).

5.1.2 Untersuchung des γ H2AX-Reparaturverhaltens nach Bestrahlung in der S-Phase

Aufgrund der zuvor beschriebenen Problematik, dass ATR während der S-Phase durch andere DNA-Schäden als DSBs aktiviert werden kann, wurde der Ansatz der S-Phase-spezifischen γ H2AX-Immunfluoreszenz zunächst für eine Analyse strahleninduzierter DSBs angewandt. Durch den Vergleich mit dem Induktions- und Reparaturverhalten in der G1- und G2-Phase sollte die generelle Anwendbarkeit dieser Methode für S-Phase-Zellen überprüft werden. Trotz der ATR-abhängigen γ H2AX-Hintergrundfärbung in S-Phase-Zellen wurden nach einer Bestrahlung diskrete γ H2AX-Foci in den BrdU-markierten Zellen sichtbar. Die strahleninduzierten DSBs führt somit lokal zu einem so starken γ H2AX-Signal, dass sich die Foci vom Hintergrund abheben.

Ein deutliches Zeichen für die Anwendbarkeit der γ H2AX-Analyse in der S-Phase ergaben die Induktionswerte, die in den drei untersuchten Zellzyklus-Phasen ermittelt wurden. Bei allen untersuchten CHO-Zelllinien zeigten G2-Zellen einen doppelt so hohen γ H2AX-Induktionswert wie G1-Zellen (Abb.4.2). Dies ist zurückzuführen auf den doppelten DNA-Gehalt von G2-Zellen und bestätigt die Ergebnisse früher Zellzyklus-abhängiger γ H2AX-Studien (Deckbar et al. 2007, Beucher et al. 2009). Für Zellen in der S-Phase kann dagegen ein intermediärer DNA-Gehalt angenommen werden. Konsistent mit dieser Annahme zeigten die S-Phase-Zellen aller untersuchten Zelllinien einen initialen γ H2AX-Wert, der zwischen

den Induktionswerten von G1- und G2-Zellen lag. Dies spricht dafür, dass die in der S-Phase detektierten γ H2AX-Foci zumindest initial die direkt durch die Bestrahlung induzierten DSBs kennzeichnen. Nach längeren Zeiten kann diese Aussage nicht mehr uneingeschränkt getroffen werden, da die Replikation während der S-Phase eine Quelle für weitere DSBs darstellen könnte. Durch die Bestrahlung wird neben den DSBs auch eine große Menge an SSBs induziert (Ward et al. 2000). Interagieren diese SSBs nun mit aktiven Replikationsgabeln kann es zur Ausbildung ein-endiger DSBs kommen, ähnlich wie es für das S-Phase-schädigende Agens CPT beschrieben ist (Strumberg et al. 2000, Pommier 2004). Die Entstehung solcher ein-endiger DSBs stellt nach Bestrahlung einen sekundären Prozess nach der direkten Induktion zwei-endiger DSBs dar. In den ermittelten γ H2AX-Kinetiken (Abb.4.2.B) könnte ein solcher Prozess der Ausbildung von sekundären DSBs und somit von sekundären γ H2AX-Foci die ablaufenden Reparaturvorgänge überdecken. Diese beiden gegenläufigen Prozesse machen eine Abschätzung des Anteils sekundär entstandener, ein-endiger DSBs nach Bestrahlung schwierig.

Zur Beurteilung der Übertragbarkeit der γ H2AX-Analyse auf die S-Phase wurde das in S-Phasen ermittelte γ H2AX-Reparaturverhalten nach einer Bestrahlung mit dem Reparaturverhalten in der G1- und G2-Phase verglichen, welches in den letzten Jahren intensiv untersucht wurde (Rothkamm et al. 2003, Beucher et al. 2009). Nach Bestrahlung in der G1- oder G2-Phase zeigen γ H2AX-Kinetiken in Wildtyp-Zellen ein biphasisches Verhalten (Löbrich et al 1995, Wu et al. 2008), das auch anhand der in dieser Arbeit erstellten γ H2AX-Kinetiken nach Bestrahlung deutlich wird (Abb.4.2.A+C). Die ersten Stunden nach der Bestrahlung sind geprägt von einer schnellen und deutlichen Abnahme der γ H2AX-Zahl. In dieser Phase läuft der NHEJ-Weg ab, über den ein Großteil der induzierten DSBs repariert wird. An diese Phase der schnellen DSB-Reparatur schließt sich eine zweite Phase mit einer deutlich geringeren Reparaturkapazität an. Diese Subpopulation an Schäden, die langsam und über mehrere Stunden hin repariert werden, ist auf Heterochromatin-assoziierte DSBs zurückzuführen (Jeggo et al. 2011). In der G2-Phase werden diese DSBs im Heterochromatin über HR-Prozesse repariert (Beucher et al. 2009). In der G1-Phase steht der Zelle lediglich der Reparaturweg des NHEJ zur Verfügung (Rothkamm et al 2003). Die langsame Reparaturkomponente ist hier auf Unterwege des NHEJ zurückzuführen, über welche die Reparatur heterochromatischer DSBs erfolgt und an denen zusätzliche Faktoren (z. B. ATM und Artemis) beteiligt sind (Goodarzi et al. 2008).

Konsistent damit, dass das NHEJ den einzigen verfügbaren DSB-Reparaturprozess in der G1-Phase darstellt, wurde in den beiden NHEJ-defizienten Zelllinien XRS-6 (Ku80-defizient) und V3 (defizient für die DNA-PKcs) ein sehr starker Reparaturdefekt in der G1-Phase beobachtet. Hier war fast keine Reparatur der induzierten DSBs zu detektieren, während die HR-defekte Zelllinie irs1SF (XRCC3-defizient) keine Beeinträchtigung in ihrer Reparaturkapazität in der G1-Phase zeigte (Abb.4.2.A). Im Gegensatz dazu bildete diese Zelllinie aber nach einer Bestrahlung in der G2-Phase einen leichten Reparaturdefekt aus. Konsistent mit

der Annahme, dass die HR in der G2-Phase auf die Reparatur Heterochromatin-assoziiierter DSBs beschränkt ist, welche mit einer langsamen Reparaturkapazität erfolgt (Beucher et al. 2009), manifestierte sich der beobachtete Reparaturdefekt erst während der langsamen Reparaturkomponente. Dieses Verhalten sowie die Stärke des Defekts (etwa 20 % der induzierten Foci-Zahl) sind vergleichbar mit dem beschriebenen Reparaturverhalten HR-defizienter, humaner Fibroblasten in der G2-Phase (Beucher et al. 2009). Im Gegensatz zu den Heterochromatin-assoziierten DSBs in der G2-Phase werden im Euchromatin erzeugte DSBs via NHEJ repariert (Jeggo et al. 2011). Konsistent mit einer Determinierung des Großteils der strahleninduzierten DSBs für den NHEJ-Weg, zeigten die in dieser Arbeit untersuchten NHEJ-Mutanten einen starken Reparaturdefekt in der G2-Phase (Abb.4.2.C).

In den nach Bestrahlung in der S-Phase erhaltenen γ H2AX-Kinetiken war zwar wie in G1- und G2-Zellen ein biphasisches Reparaturverhalten zu erkennen, die schnelle Reparaturkomponente war dabei aber oft weniger stark ausgeprägt (Abb.4.2.B). Dies könnte auf die Induktion sekundärer DSBs zurückzuführen sein, welche die bereits ablaufenden Reparaturprozesse überdecken. Im Vergleich zur G1- und G2-Phase ergaben sich Unterschiede im Beitrag von HR und NHEJ an der Reparatur strahleninduzierter DSBs in der S-Phase. Die HR-defizienten *irs1SF*-Zellen zeigten hier den stärksten Reparaturdefekt. Etwa 50 % der Schäden blieben im Untersuchungszeitraum unrepariert, was eine größere Bedeutung der HR für die Reparatur strahleninduzierter DSBs in der S-Phase verdeutlicht. Passend hierzu konnten die untersuchten NHEJ-defizienten Zellen einen größeren Anteil der DSBs in der S-Phase reparieren als in der G1- und G2-Phase (Abb.4.2.B). Dies ist konsistent mit Überlebensstudien mit synchronisierten V3-Zellen (defizient für die DNA-PKcs), welche die S-Phase als die Zellzyklus-Phase beschrieben haben, in der diese Zellen die geringste Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung aufweisen (Chen et al. 2005).

Nach einer Bestrahlung in der S-Phase sollten unterschiedliche Arten von DSB erzeugt werden, die sich in ihrer Determinierung für einen Reparaturweg unterscheiden. So sollten sekundär entstandene, Replikations-assoziierte DSBs für den HR-Weg determiniert sein. Dagegen sollte für die Reparatur von DSBs, die in noch unreplizierten Bereichen des Genoms entstehen, lediglich der NHEJ-Weg zur Verfügung stehen, da eine für den HR-Vorgang essentielle Schwesterchromatide fehlt. Eine quantitative Abschätzung dieser unterschiedlichen DSB-Arten in der S-Phase ist aber schwierig. Dennoch erscheint das Reparaturverhalten in bestrahlten S-Phase-Zellen plausibel.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Detektion einer erwarteten Anzahl strahleninduzierter γ H2AX-Foci in der S-Phase sowie das plausibel erscheinende Reparaturverhalten der untersuchten Zelllinien dafür sprechen, dass γ H2AX-Foci auch während der S-Phase einen zuverlässigen Marker für strahleninduzierte DSBs darstellen. Daraufhin wurde die Methode der S-Phase-spezifischen γ H2AX-Analyse auch für die Untersuchung MMS-induzierter Schäden angewandt.

5.1.3 Zellzyklus-spezifische Bestimmung der Induktion von γ H2AX-Foci nach Behandlung mit MMS

Bei der Untersuchung des γ H2AX-Induktionsverhaltens nach einer MMS-Behandlung wurde eine sehr deutliche Zellzyklus-Abhängigkeit der erzeugten γ H2AX-Foci beobachtet. Während in S-Phase-Zellen eine konzentrationsabhängige Induktion von γ H2AX-Foci nach einer Behandlung mit MMS detektiert wurde, traten in G1- und G2-Zellen kaum zusätzliche γ H2AX-Foci auf (Abb.4.3). Diese Beobachtung bestätigt die Annahme, dass sich die schädigende Wirkung von MMS während der S-Phase manifestiert. Zusammen mit Beobachtungen, dass MMS-induzierte γ H2AX-Foci mit Replikations-Markern kolokalisieren (Groth et al. 2010), weist dies auf einen Zusammenhang der DNA-Schädigung durch MMS mit Replikationsvorgängen hin. Eine MMS-abhängige Ausbildung von γ H2AX-Foci wurde bereits in früheren Veröffentlichungen beschrieben (Pascucci et al. 2005, Staszewski et al. 2008). Die γ H2AX-Analysen wurden in diesen Studien aber nicht Zellzyklus-spezifisch durchgeführt, stattdessen wurde nur der prozentuale Anteil an Zellen mit γ H2AX-Foci oder die durchschnittliche Zahl an γ H2AX-Foci bezogen auf die Gesamtheit der Zellpopulation bestimmt. Die großen Unterschiede in der γ H2AX-Induktion, die in der vorliegenden Arbeit für G1-, S- und G2-Zellen detektiert wurden (Abb.4.3), verdeutlichen, dass eine γ H2AX-Analyse der Gesamtpopulation für eine genaue Abschätzung des Schadenslevels nach MMS weniger sinnvoll ist. Die in dieser Arbeit angewandte S-Phase-spezifische Analyse der γ H2AX-Foci ermöglicht dagegen eine gezielte Untersuchung des Induktions- und Reparaturverhaltens von DNA-Schäden nach MMS in der am stärksten betroffenen Zellpopulation.

In G1- und G2-Zellen konnte nach Behandlung mit sehr hohen MMS-Konzentrationen (≥ 2 mM) eine leichte Zunahme an γ H2AX-Foci detektiert werden (Abb.4.3). Dies spricht dafür, dass auch ein Replikations-unabhängiger Weg existiert, der zur Ausbildung von DSBs nach MMS beiträgt. Während der Reparatur MMS-induzierter Basenmethylierungen über den Weg der BER kommt es zur temporären Ausbildung von SSBs (Wyatt + Pittman 2006). Treten nun zwei SSBs gleichzeitig und nahe beieinander auf gegenüberliegenden DNA-Strängen auf, kann dies zur Ausbildung eines DSBs führen. Hier ist der DSB somit die Folge zweier zu dicht beieinander auftretender BER-Intermediate (siehe Abb.5.1). Ein solcher Prozess wurde erst kürzlich für MMS-behandelte G2-Zellen bestätigt (Ma et al. 2011). Die Wahrscheinlichkeit für einen solchen Prozess steigt dabei mit der applizierten MMS-Konzentration an. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass XRCC1-defiziente Zellen, in denen die erzeugten SSBs persistieren, schon bei niedrigeren MMS-Konzentrationen γ H2AX-Foci in der G2-Phase ausbilden (Abb.4.8.C). Ein ähnlicher Prozess wie hier nach MMS wurde auch für die SSB-induzierende Chemikalie CPT postuliert, denn bei hohen CPT-Konzentrationen scheinen gegenüberliegend erzeugte SSBs ebenfalls zur Ausbildung von DSBs außerhalb der S-Phase zu führen (Wu + Liu 1997).

5.2 Beitrag von BER-Intermediaten zur schädigenden Wirkung von MMS

Nachdem mit Hilfe der Zellzyklus-spezifischen γ H2AX-Analyse gezeigt wurde, dass im relevanten Konzentrationsbereich von MMS γ H2AX-Foci lediglich während der S-Phase induziert werden, sollte die Entstehung dieser DNA-Schäden genauer untersucht werden. Als Quelle für MMS-abhängige Replikations-Schäden werden sowohl die direkt durch MMS induzierten Basenmethylierungen als auch die während der Reparatur dieser Schäden erzeugten SSBs diskutiert. In unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, dass einige der durch MMS induzierten, methylierten Basen in der Lage sind die Replikation zu blockieren und somit Replikationsgabeln zu arretieren (Larson et al. 1985, Engelward et al. 1998). Ein Kollabieren dieser arretierten Replikationsgabeln könnte zur Ausbildung von ein-endigen DSBs führen, die als γ H2AX-Foci sichtbar würden. Andere Studien gaben aber starke Hinweise darauf, dass die während der BER temporär erzeugten SSBs zur Ausbildung Replikations-assoziiierter Schäden beitragen. Diese Studien wurden in der Regel mit Zelllinien mit einem Gendefekt eines BER-Faktors (z. B. Pol β oder XRCC1) durchgeführt, der in einer Akkumulation von SSBs nach einer Behandlung mit Alkylanzien resultiert. Im Mausexperiment sind Nullmutationen im Pol β - oder XRCC1-Genlocus embryonal letal (Gu et al. 1994, Tebbs et al. 1999) und sowohl für Pol β - als auch für XRCC1-defiziente Zellen wurde eine starke Empfindlichkeit gegenüber MMS beschrieben (Sobol et al. 1996, Thompson et al. 1982). Diese Hypersensitivität wird begleitet von der Ausbildung zahlreicher chromosomaler Aberrationen nach einer Behandlung mit alkylierenden Agenzien (Dominguez et al. 1998). Diese starke Auswirkung einer Defizienz in einem dieser beiden BER-Faktoren könnte auf eine stärkere Störung der Replikation durch die akkumulierten BER-Intermediate zurückzuführen sein. Aber auch der im vorherigen Abschnitt beschriebene Prozess einer Replikations-unabhängigen DSB-Induktion nach MMS, der in diesen Zelllinien stärker ausgeprägt ist als in Wildtyp-Zellen, könnte zu diesen Effekten beitragen.

5.2.1 Während der BER erzeugte SSBs tragen zur Ausbildung Replikations-assoziiierter DNA-Schäden nach MMS bei

Zur Abschätzung des Beitrags von BER-Intermediaten an der Induktion von γ H2AX-Foci nach Behandlung mit MMS, wurde in dieser Arbeit das γ H2AX-Induktionsverhalten der XRCC1-defizienten Hamsterzelllinie EM-C11 untersucht. Aufgrund einer Punktmutation, die zu einer *Missense*-Mutation führt, exprimieren diese Zellen keine funktionalen XRCC1-Polypeptide (Shen et al. 1998). Durch Methoden wie dem alkalischen Elutions- oder dem Comet-Assay konnte in EM-C11-Zellen sowie in anderen XRCC1-defizienten Hamsterzellen eine Beeinträchtigung der SSB-Reparatur nach unterschiedlichen Agenzien (z. B. MMS) nachgewiesen werden (Thompson et al. 1982, Zdzienicka et al. 1992).

Konsistent mit der beschriebenen Hypersensitivität XRCC1-defizienter Zelllinien zeigten EM-C11-Zellen auch auf γ H2AX-Ebene eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit gegenüber MMS. Bereits bei der geringsten, eingesetzten MMS-Konzentration von 0,1 mM bildeten EM-C11 in der S-Phase die gleiche Anzahl an γ H2AX-Foci aus wie der korrespondierende Wildtyp CHO-9 nach 1,5 mM MMS (Abb.4.8.B). Das bedeutet, dass bereits eine um einen Faktor von 15 geringere MMS-Konzentration ausreichte um in EM-C11 das gleiche γ H2AX-Level zu induzieren wie in Wildtyp-Zellen. Wurden EM-C11-Zellen dagegen wie der Wildtyp mit einer Konzentration von 1,5 mM MMS behandelt, zeigten sie ein so starkes γ H2AX-Signal, dass eine sichere Bestimmung der Anzahl an γ H2AX-Foci in der S-Phase nicht möglich war. Die Zellen zeigten ein einheitliches, flächiges γ H2AX-Signal, in dem keine diskreten Foci mehr erkennbar waren (Abb.4.8.A). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die als BER-Intermediate erzeugten und in EM-C11 persistierenden SSBs die Replikation stören und zur Ausbildung von γ H2AX-Foci beitragen (siehe Abb.5.1). Darüber hinaus wurde in EM-C11-Zellen aber auch eine Zunahme an Replikations-unabhängigen γ H2AX-Foci beobachtet, denn nach 1,5 mM MMS wiesen diese Zellen auch in der G2-Phase deutlich mehr Foci auf als der Wildtyp (Abb.4.8.C). Da die erzeugten SSBs in diesen Zellen persistieren, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass zwei dicht benachbarte SSBs zu einem DSB führen. Bei einer Konzentration von 0,1 mM MMS, bei der das Reparaturverhalten in EM-C11 untersucht wurde, spielt dieser Prozess aber nur eine vernachlässigbare Rolle.

Diese große Wirkung persistierender SSBs in EM-C11 stellt einen starken Hinweis dafür dar, dass die γ H2AX-Foci auch im Wildtyp auf Prozesse zurückzuführen sind, bei denen eine Replikationsgabel auf einen solchen SSB trifft. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass im Wildtypen auch andere Ereignisse wie durch methylierte Basen arretrierte Replikationsgabeln zur Erzeugung von γ H2AX-Foci beitragen. Bei der Ausbildung von γ H2AX-Foci in EM-C11-Zellen nach 0,1 mM MMS sollte die Wirkung dieser methylierten Basen, aber vernachlässigbar sein. Sowohl der starke Effekt einer XRCC1-Defizienz auf die γ H2AX-Induktion in EM-C11-Zellen als auch das vergleichbare γ H2AX- und Rad51-Reparaturverhalten von Wildtyp und XRCC1-Mutante (Abb.4.9) bekräftigen die Annahme, dass in beiden Zelllinien die gleichen Vorgänge zur Ausbildung von γ H2AX-Foci beitragen.

Unterstützt wird diese Theorie auch durch Studien, in denen Abschätzungen über die Rate MMS-induzierter Basenmethylierungen und SSBs getroffen wurden. Die Kalkulationen dieser Studien ergaben nach einer Behandlung mit 1,5 mM MMS für das menschliche Genom einen Wert von $1,3 \times 10^6$ Basenmethylierungen nach einer Behandlungsdauer von 40 min (Groth et al. 2010) bzw. von $2,7 \times 10^6$ Methylierungen nach einer 1-stündigen Behandlung (Lundin et al. 2005). Ebenfalls durchgeführte Messungen des SSB-Levels ergaben etwa 5.000 SSBs in Wildtyp- und 25.000 SSBs in XRCC1-defizienten Zellen nach einer 15-minütigen Behandlung mit 1,5 mM MMS (Groth et al. 2010). Zwar beziehen sich diese Kalkulationen auf unterschiedliche Behandlungsbedingungen, dennoch wird deutlich, dass die erhaltenen Werte in völlig unterschiedlichen Größenbereichen liegen. SSBs werden in den Zellen nach MMS

deutlich weniger nachgewiesen als Basenmethylierungen, was auf die kurze Halbwertszeit der SSBs während der BER zurückzuführen ist. Während die durch MMS erzeugten, methylierten Basen zum Teil über Stunden in der DNA persistieren (Osborn + Phillipse et al. 2000), können in der Zelle immer nur solche SSBs detektiert werden, die während der gerade ablaufenden BER-Vorgänge erzeugt werden. Vergleicht man diese Werte nun mit der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Zahl an γ H2AX-Foci nach 1,5 mM MMS, wird deutlich, dass die Ausbildung eines γ H2AX-Focus ein sehr seltenes Ereignis darstellt. Einer Zahl von mehr als zwei Millionen durch MMS methylierten Basen (Lundin et al. 2005) stehen hier je nach Zellsystem zwischen 30 und 50 γ H2AX-Foci pro S-Phase-Zelle gegenüber. Dies scheint ein Ausdruck dessen zu sein, dass Replikationsgabeln nur selten mit den temporär auftretenden und kurzlebigen SSBs interferieren.

Auch wenn die durch γ H2AX-Foci gekennzeichneten DNA-Schäden ein sehr seltenes Ereignis nach MMS darstellen, verdeutlichen die zahlreichen Überlebensstudien mit XRCC1- oder Pol β -defizienten Zellen, dass gerade diese Ereignisse ein starkes toxisches Potential besitzen (Sobol et al. 1996, Horton et al. 2008). Dass diese toxische Wirkung von MMS und anderen Alkylanzien tatsächlich primär auf BER-Intermediate zurückzuführen ist, belegen Studien mit Zelllinien, in denen die BER initial gehemmt wird (Sobol et al. 2003). Mauszellen mit einer Nullmutation im Gen der DNA-Glykosylase AAG können die BER nicht einleiten und MMS-induzierte Basenmethylierungen persistieren in diesen Zellen. Interessanterweise zeigen diese Zellen in Überlebensexperimenten keine Empfindlichkeit gegenüber MMS. Darüber hinaus kann eine Nullmutation dieser Glykosylase die Hypersensitivität von Pol $\beta^{-/-}$ -Zellen gegenüber MMS aufheben. Pol $\beta^{-/-}$ /AAG $^{-/-}$ -Zellen zeigen ein kaum beeinträchtigtes zelluläres Überleben nach MMS (Sobol et al. 2003). Diese Studie verdeutlicht, dass die schädigende Wirkung von MMS auf der Ebene des zellulären Überlebens abhängig ist von der Induktion der BER und der damit verbundenen Ausbildung von SSBs. Diese Schlussfolgerung wird von weiteren Publikationen unterstützt, die einen nachteiligen Effekt einer Überexpression von DNA-Glykosylasen beschrieben haben. So resultiert eine solche Überexpression beispielsweise in einer stärkeren Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Alkylanzien (Calleja et al. 1999, Paik et al. 2005). Dennoch ist eine Unterdrückung der BER für die Zellen nicht von Vorteil, was dadurch verdeutlicht wird, dass Pol $\beta^{-/-}$ -Mäuse auch nach einer Inaktivierung des AAG-Gens nicht lebensfähig sind (Sobol et al. 2003). Zwar treten ohne BER-Vorgänge weniger Replikations-assoziierte DNA-Schäden auf, allerdings gehen die persistierenden Basenmethylierungen mit einer verstärkten Mutations-Rate einher. So konnten Studien belegen, dass eine Inhibition der Glykosylase die Mutagenese nach einer MMS-Behandlung fördert, wohingegen eine AAG-Überexpression die Mutations-Rate absenken kann (Sobol et al. 2002).

Zusammengefasst erbringen diese Publikationen und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit das paradoxe Ergebnis, dass die Reparatur der MMS-induzierten Basenschäden über den BER-Weg die Quelle für die toxische Wirkung von MMS darstellt. Die Zelle befindet sich

nach einer MMS-Behandlung in einer Situation, in der sie die methylierten Basen beheben muss, um die Ausbildung von Punktmutationen zu verhindern, gleichzeitig erzeugt sie während den eingeleiteten Reparaturprozessen aber Strukturen, die in der Verbindung mit der Replikation potentiell toxisch wirken können.

Im Zusammenhang mit den zuvor beschriebenen Studien wäre es in Zukunft interessant den Einfluss einer Depletion von DNA-Glykosylasen auch auf Ebene der γ H2AX-Induktion nach einer MMS-Behandlung zu untersuchen. Ohne diese Enzyme sollten nach MMS kaum SSBs erzeugt werden, die mit der Replikationsgabel interagieren können. Ein Ausbleiben MMS-induzierter γ H2AX-Foci in diesen Zellen würde die Annahme bestätigen, dass die replikative Schädigung der DNA auf solche SSBs zurückzuführen ist. Eine Vielzahl an Hinweisen unterstützt dabei die Annahme, dass es bei der Interaktion von Replikationsgabeln mit SSBs zur Ausbildung ein-endiger DSBs kommt. Diese Theorie wird in Kapitel 5.3 genauer diskutiert.

5.2.2 MMS-induzierte Basenschäden und während der BER erzeugte SSBs hemmen die Replikation

Die durch MMS induzierten Basenmethylierungen scheinen zwar kaum zur Ausbildung von γ H2AX-Foci beizutragen, dennoch könnten sie Replikationsgabeln zumindest transient arretieren. Eine solche blockierende Wirkung auf die Replikation wurde für einige bestimmte Basenmethylierungen (z. B. N3-Methyladenin) bereits nachgewiesen (Larson et al. 1985, Engelward et al. 1998). Anhand der durchflusszytometrischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte eine Replikations-hemmende Wirkung von MMS bestätigt werden. So wurde in allen untersuchten Zelllinien nach einer Behandlung mit MMS eine Verlangsamung der Progression durch die S-Phase beobachtet (z. B. Abb.4.7, Abb.4.10, Abb.4.12). Zu dieser verminderten Replikations-Rate könnten nun aber sowohl die transienten Replikations-Blockaden durch methylierte Basen als auch die durch γ H2AX-Foci gekennzeichneten ein-endigen DSBs beitragen.

Eine Beurteilung des Beitrags dieser beiden unterschiedlichen Schadens-Arten wurde durch Untersuchungen der Zellzyklus-Progression in XRCC1-defizienten EM-C11-Zellen möglich. Diese zeigten nach einer Behandlung mit 0,1 mM MMS zwar eine deutliche Verzögerung der S-Phase-Progression im Vergleich zu unbehandelten Zellen, diese Verzögerung war aber etwas weniger stark ausgeprägt als in Wildtyp-Zellen nach 1,5 mM MMS (Abb.4.10.A). Da die beiden Zelllinien bei diesen MMS-Konzentrationen die gleiche Zahl an γ H2AX-Foci ausbilden (Abb.4.8), muss die stärkere Beeinträchtigung der Replikation im Wildtyp auf andere Ereignisse zurückzuführen sein. Da aufgrund der höheren MMS-Konzentration in diesen Zellen deutlich mehr Basenmethylierungen erzeugt werden als in EM-C11, erscheint es wahrscheinlich, dass durch methylierte Basen bedingte Replikations-Arreste für diesen Effekt verantwortlich sind. Diese methylierten Basen scheinen aber nur einen geringeren Beitrag zur Hemmung der Replikation zu leisten als die ein-endigen DSBs, denn der im Wildtyp

detektierte additive Effekt bei der Verlangsamung der S-Phase-Progression war im Vergleich zu EM-C11 relativ gering (Abb.4.10.A). Die starke Beeinträchtigung, die in EM-C11-Zellen bereits nach 0,1 mM MMS auftrat, verdeutlicht dagegen den starken Einfluss ein-endiger DSBs auf die Hemmung der Replikation. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung auch durch das Zellzyklusverhalten von Wildtyp-Zellen (CHO-9), die mit 0,1 mM MMS behandelt wurden. Nach dieser Behandlung kann in diesen Zellen eine vergleichbare Induktion an Basenmethylierungen angenommen werden wie in EM-C11 nach der gleichen MMS-Konzentration, die Zahl an erzeugten DSBs sollte im Wildtypen aber deutlich geringer sein. Unter diesen Bedingungen zeigten Wildtyp-Zellen fast keine Beeinträchtigung in der Progression durch die S-Phase (Abb.4.10.A). Die methylierten Basen haben die Replikations-Rate hier also kaum beeinflusst.

Somit demonstrieren die durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen, dass sowohl die erzeugten ein-endigen DSBs als auch die primär induzierten Basenmethylierungen eine hemmende Wirkung auf die Replikation besitzen. Ein-endige DSBs leisten dabei einen deutlich stärkeren Beitrag zu diesem Effekt. Das Modell einer doppelten Hemmung der S-Phase-Progression nach MMS ist konsistent mit den Ergebnissen verschiedener anderer Studien, in denen sowohl nach einer Depletion als auch nach einer Überexpression von DNA-Glykosylasen verlangsamte Replikations-Raten beschrieben wurden (Paik et al. 2005, Coquerelle et al. 1995). Im Fall einer Depletion der Glykosylasen wird die BER nicht eingeleitet und die Basenmethylierungen persistieren. Die verlangsamte S-Phase-Progression ist hier auf die durch diese Basen verursachten, transienten Replikations-Arreste zurückzuführen. Nach einer Überexpression der Glykosylasen ist dieser Effekt dagegen auf die verstärkt ablaufende BER und die damit verbundenen vermehrt auftretenden SSBs zurückzuführen, die mehr DSBs verursachen als in Wildtyp-Zellen.

Der Einfluss MMS-induzierter Schäden auf die Replikation wurde auch in einer neueren Studie untersucht (Groth et al. 2010). Hier wurde neben durchflusszytometrischen Messungen vor allem die relativ neue Methode des *DNA fibre assay* angewandt, die eine Analyse auf Ebene einzelner Replikationsgabeln ermöglicht (Petermann et al. 2008). Mit dieser Methode konnte nach einer MMS-Behandlung eine deutliche Verlangsamung in der Replikationsrate beobachtet werden. Nach 1,5 mM MMS wurde in einem Zeitraum von 1 h nach Behandlung fast keine DNA-Neusynthese detektiert (Groth et al. 2010). Dieses Ergebnis ist konsistent mit der in der vorliegenden Arbeit anhand der Durchflusszytometrie ermittelten Verlangsamung der S-Phase-Progression nach MMS. Ein Unterschied besteht aber darin, dass Groth et al. davon ausgehen, dass die Beeinträchtigung der Replikation unabhängig von SSBs erfolgt. In dieser Studien konnten anhand des *DNA fibre assay* keine Unterschiede im Verhalten von XRCC1-defizienten Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen ermittelt werden (Groth et al. 2010).

Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studie und der vorliegenden Arbeit könnten auf unterschiedliche Untersuchungs-Zeiträume zurückzuführen sein. Groth et al. analysierten

das Verhalten der Replikationsgabeln nur während der ersten Stunde nach der MMS-Behandlung, während das Zellzyklusverhalten in dieser Arbeit über mehrere Stunden verfolgt wurde. Es wäre denkbar, dass sich die Replikations-hemmende Wirkung MMS-induzierter DSBs zu späteren Zeiten stärker manifestiert. So wurde die in den FACS-Analysen dieser Arbeit beobachtete, verlangsamte S-Phase-Progression in XRCC1-defizienten Zellen nach 0,1 mM MMS zwar schon innerhalb der ersten Stunde nach der Behandlung erkennbar, mit zunehmender Beobachtungszeit wurde der Effekt aber deutlicher (Abb.4.10.A). Ein weiterer Unterschied zwischen der vorliegenden Arbeit und der Veröffentlichung von Groth et al. besteht in der eingesetzten MMS-Konzentration. Die Aussagen über den Einfluss MMS-induzierter DSBs auf die Progression durch die S-Phase wurden in dieser Arbeit anhand von Zellzyklus-Studien nach einer Behandlung mit 0,1 mM MMS getroffen. Im Gegensatz dazu wurden die Analysen in der beschriebenen Publikation bei einer deutlich höheren Konzentration von 3 mM MMS durchgeführt. Bei dieser Bedingung wurde mit dem *DNA fibre assay* bereits in Wildtyp-Zellen eine sehr starke Beeinträchtigung der Replikation beobachtet (Groth et al. 2010). Da somit schon in Wildtyp-Zellen kaum eine DNA-Neusynthese nach 3 mM MMS stattfand, erscheint es nicht überraschend, dass keine zusätzliche Wirkung einer XRCC1-Defizienz detektiert wurde. Diese Beobachtung wäre somit kein Zeichen dafür, dass SSBs bzw. die daraus resultierenden DSBs keinen Beitrag an der Hemmung der Replikation haben, sondern würde nur eine Sättigung dieses Effekts bei zu hohen MMS-Konzentrationen verdeutlichen. Eine solche Sättigung kann auch anhand der durchflusszytometrischen Messungen dieser Arbeit erahnt werden. Nach einer Behandlung mit 1,5 mM MMS zeigten Wildtyp-Zellen (CHO-9) in den ersten 2 h nach der Behandlung keine Progression im Zellzyklus. Der Anteil BrdU-markierter S-Phase-Zellen blieb während dieses Zeitraums konstant, was auf eine starke Hemmung der Replikation hindeutet (Abb.4.10.A). Auch in XRCC1-defizienten Zellen wäre bei dieser Bedingung daher kein stärkerer Effekt zu erwarten. Die in der vorliegenden Arbeit getroffenen Aussagen stehen somit nicht im Konflikt mit den zuvor beschriebenen, publizierten Ergebnissen (Groth et al. 2010). In dieser Studie wäre es vielleicht günstiger gewesen auch niedrigere MMS-Konzentrationen einzusetzen, bei denen Wildtyp-Zellen nur eine schwache Beeinträchtigung der Replikation zeigen. Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wäre unter solchen Bedingungen ein stärkerer Effekt in XRCC1-defizienten Zellen zu erwarten.

Ausgehend von den Ergebnissen der Reparaturstudien und der durchflusszytometrischen Analysen der vorliegenden Arbeit kann zwischen verschiedenen Wirkungen der MMS-induzierten Basenmethylierungen unterschieden werden. Diese sind in Abb.5.1 zusammengefasst. Einige der induzierten Basenmethylierungen können die Replikationsgabel transient arretieren und tragen so zur verlangsamten Progression MMS-behandelter Zellen durch die S-Phase bei (Abb.5.1.A). Wie genau diese Replikations-Blockaden überwunden werden, kann nicht beurteilt werden, mit der *translesion synthesis*, dem Vorgang der *fork regression*

und dem Prozess des *lesion bypass* stehen der Zellen aber effektive Mechanismen für eine Überwindung solcher Blockaden zur Verfügung. Auch HR-abhängige Prozesse könnten hieran beteiligt sein. Um die Ausbildung von Punktmutationen zu verhindern werden durch MMS methylierte Basen über den BER-Weg repariert. Die dabei temporär erzeugten SSBs besitzen aber ein hohes toxisches Potential, da sie mit Replikationsgabeln interferieren können, wobei ein-endige DSBs erzeugt werden (Abb.5.1.B). Diese DSBs können als γ H2AX-Foci sichtbar gemacht werden (siehe auch Kapitel 5.3) und müssen über HR-abhängige Reparaturvorgänge behoben werden. Bei sehr hohen MMS-Konzentrationen treten zusätzlich Replikations-unabhängige, zwei-endige DSBs auf. Diese sind auf Ereignisse zurückzuführen, bei denen durch BER-Vorgänge gleichzeitig in beiden DNA-Strängen je ein SSB mit geringem Abstand zueinander ausgebildet wird (Abb.5.1.C).

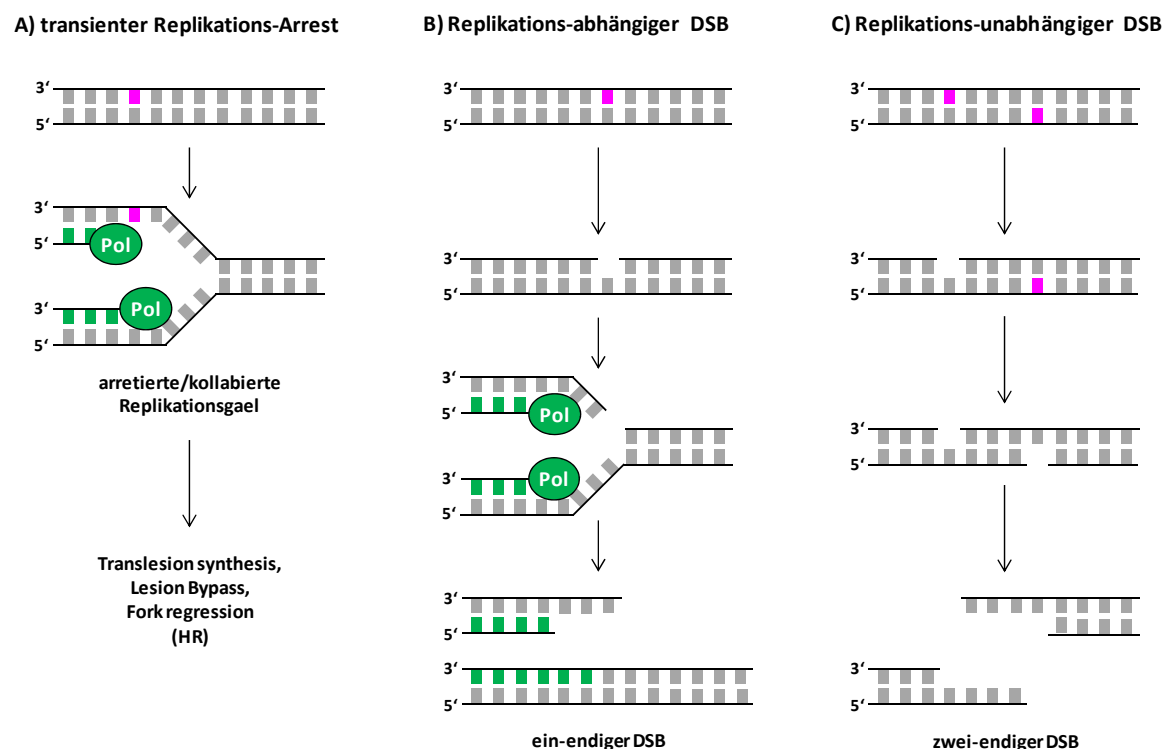


Abb.5.1: Unterschiedliche Prozesse tragen zur DNA-schädigenden Wirkung von MMS bei

(A) Eine durch MMS methylierte Base (pink) kann über mehrere Stunden in der DNA persistieren. Trifft eine Replikationsgabel auf diese Läsion, kann die DNA-Synthese blockiert werden und die Replikationsgabel wird arretiert. Die Zelle kann eine solche Blockade der Replikation effizient mit Hilfe der *translesion synthesis* überwinden. Darüber hinaus, stehen ihr durch den Prozess der *fork regression* der Weg des *lesion bypass* und die Möglichkeit zur Überbrückung der Zeit zur Verfügung, bis die blockierende Läsion entfernt wurde. Bei einem langanhaltenden Arrest kann die Replikationsgabel auch kollabieren. Dann werden HR-abhängige Wege zur Re-Initiierung der Replikation nötig. (B) Wird eine methylierte Base über den BER-Weg repariert, wird ein temporärer SSB ausgebildet, der die Replikation stören kann. Wird dadurch die Synthese des Leitstrangs betroffen, kann ein Prozess des *replication fork run-off* postuliert werden, der zur Ausbildung eines ein-endigen DSBs führt, welcher über HR-abhängige Wege repariert werden muss. (C) Bei hohen MMS-Konzentrationen kann es auch zu einer Replikations-unabhängigen Ausbildung eines DSBs kommen, wenn durch BER-Prozesse auf beiden DNA-Strängen zur gleichen Zeit zwei SSBs in direkter räumlicher Nähe erzeugt werden. Im Gegensatz zum Replikations-abhängigen Weg entsteht hier ein zwei-endiger DSB.

5.3 MMS-induzierte γ H2AX-Foci treten an ein-endigen DSBs auf

5.3.1 Bewertung der Beobachtungen nach MMS-Behandlung im Vergleich zu anderen S-Phase-schädigenden Agenzien

Eine wichtige aber nicht abschließend zu beantwortende Frage ist, welche DNA-Schäden die nach MMS auftretenden γ H2AX-Foci kennzeichnen. Anhand der zuvor erörterten Ergebnisse der γ H2AX-Induktion in XRCC1-Zellen ist davon auszugehen, dass zumindest der größte Teil der durch MMS erzeugten γ H2AX-Foci auf eine Störung der Replikation durch SSBs zurückzuführen ist. Dieser Prozess scheint vergleichbar zu sein mit der Wirkungsweise von CPT. Dieser Inhibitor der Topoisomerase I erzeugt SSBs, die ebenfalls zu einer Störung der Replikation und somit zur Ausbildung ein-endiger DSBs führen (Pommier 2004). Dabei geht man davon aus, dass es zu einem Prozess kommt, der als *replication fork run-off* bezeichnet wird. Dieser Ausdruck beschreibt eine Dissoziation der DNA-Polymerasen von der DNA, wenn sie auf einen SSB treffen, wodurch ein Arm der Replikationsgabel abfällt und einen ein-endigen DSB ausbildet. Dieser Prozess ist dabei auf SSBs auf dem Leitstrang begrenzt, bei SSBs auf dem Folgestrang scheint er dagegen nicht aufzutreten (Strumberg et al. 2000, Pommier 2004). Ein solcher Prozess des *replication fork run-off* bei der Leitstrang-Synthese kann auch für die SSBs nach einer MMS-Behandlung postuliert werden. In diesem Fall würden die γ H2AX-Foci die durch diesen Prozess entstandenen ein-endigen DSBs kennzeichnen.

Ein weiterer zellulärer Prozess, der zur Ausbildung ein-endiger DSBs führt, ist das Kollabieren arretierter Replikationsgabeln. Wird ein Replikations-Arrest über längere Zeit aufrechterhalten, dissoziieren die Proteine des Replisoms von der Replikationsgabel. Die Replikation kann hier nun nicht mehr direkt re-initiiert werden, die Replikationsgabel gilt als inaktiviert (Petermann et al. 2010). Diese inaktive Replikationsgabel wird nun gezielt durch den Endonuklease-Komplex Mus81-Eme1 geschnitten (Froget et al. 2008). Dadurch wird ein ein-endiger DSB erzeugt, der eine Re-Initiierung einer intakten und aktiven Replikationsgabel über HR-Vorgänge ermöglicht (Petermann + Helleday 2010). Diese Prozesse können zum Beispiel nach einer Behandlung mit HU beobachtet werden (Saintigny et al. 2001). Dabei führen kurzzeitige HU-Behandlungen lediglich zu einem transienten Arrest der aktiven Replikationsgabeln. Nach Entfernen des Agens kann die Replikation an einem Großteil dieser Replikationsgabeln wieder aufgenommen werden (Petermann et al. 2010). Ein Kollabieren der arretierten Replikationsgabeln tritt erst nach längeren Behandlungen mit HU auf. So können die ersten DSBs etwa nach 6 h HU-Behandlung detektiert werden und die DSB-Zahl steigt danach über mehrere Stunden an (Saintigny et al. 2001, Hanada et al. 2007). Die Veröffentlichung von Hanada et al. war die erste, in der eine Abhängigkeit der Ausbildung ein-endiger DSBs nach langen HU-Behandlungszeiten von der Mus81-Aktivität beschrieben

wurde. In Mus81-defizienten Zellen konnten auch nach sehr langen HU-Behandlungen kaum DSBs detektiert werden. Außerdem zeigten diese Zellen in Überlebensexperimenten eine stärkere Empfindlichkeit gegenüber HU (Hanada et al. 2007). Gemessen wurden die HU-induzierten DSBs in dieser Studie mit der Methode der Pulsfeld-Gelelektrophorese. Die Beobachtungen, dass DSBs erst nach einer mehrstündigen HU-Behandlung auftreten, konnte in unserer Arbeitsgruppe aber auch auf γ H2AX-Ebene bestätigt werden. Nach einer 2-stündigen Behandlung mit HU zeigen S-Phase-Zellen ein flächiges γ H2AX-Signal ohne diskrete γ H2AX-Foci. Unter solchen Behandlungsbedingungen, bei denen die Replikationsgabeln lediglich arretiert, aber nicht kollabiert vorliegen, treten also keine γ H2AX-Foci auf. Nach einer HU-Behandlung über 24 h werden dagegen γ H2AX-Foci in großer Zahl ausgebildet (persönliche Mitteilung Lucie Iloff). Dies spricht dafür, dass γ H2AX-Foci nur an kollabierten Replikationsgabeln und somit an ein-endigen DSBs ausgebildet werden, nicht aber an arretierten Replikationsgabeln. Es ist bekannt, dass ATR durch einzelsträngige DNA-Bereiche aktiviert wird, wie sie an arretierten Replikationsgabeln verstärkt auftreten (Shechter et al. 2004b). Diese Aktivierung könnte verantwortlich sein für das flächige γ H2AX-Signal, das nach kurzzeitigen HU-Behandlungen auftritt.

Überträgt man diese Ergebnisse auf die Behandlung nach MMS, spricht dies dafür, dass die detektierten γ H2AX-Foci auch ein-endige DSBs kennzeichnen. Zwar können auch nach MMS Replikationsgabeln durch methylierte Basen arretiert werden, basierend auf den Beobachtungen nach HU-Behandlung sollten die einzelsträngigen Bereiche an diesen Strukturen aber nur zu einer begrenzten H2AX-Phosphorylierung führen, die nicht als Focus detektierbar wird. Diese Phosphorylierung sollte lediglich in Form eines flächigen γ H2AX-Hintergrundsignals sichtbar werden. In der Tat wurde in MMS-behandelten S-Phase-Zellen generell eine stärkere Hintergrundfärbung beobachtet als in unbehandelten Zellen (Daten nicht dargestellt). Somit scheinen die MMS-induzierten γ H2AX-Foci also weitgehend auf ein-endige DSBs zurückzuführen zu sein, die bei der Interaktion von SSBs mit der Replikation entstanden sind. Die Annahme eines Prozesses, der mit dem *replication fork run-off* nach CPT vergleichbar ist, erscheint dabei plausibel.

Dennoch kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass auch SSB-unabhängige Prozesse zur Ausbildung ein-endiger DSBs beitragen. Ein Kollabieren von Replikationsgabeln, die durch einen Basenschaden für mehrere Stunden arretiert werden, ist denkbar. Analog zu den bestehenden HU-Studien, würde man einen solchen Prozess erst nach längeren Zeiten nach einer MMS-Behandlung erwarten, was eine Abschätzung der Bedeutung solcher Vorgänge aufgrund der übrigen γ H2AX-Induktions- und Reparaturprozesse schwierig macht. Genauere Aussagen könnten anhand von Untersuchungen Mus81-defizienter Zellen getroffen werden. Wie nach einer HU-Behandlung (Hanada et al. 2007) sollten inaktivierte Replikationsgabeln auch nach MMS ohne Mus81 nicht in ein-endige DSBs umgewandelt werden. Durch einen Vergleich von γ H2AX-Reparaturkinetiken Mus81-defizienter und Mus81-profizienter Zellen könnte eine quantitative Abschätzung einer SSB-unabhängigen

DSB-Ausbildung nach MMS getroffen werden. Generell ist aber nur eine geringe Bedeutung dieses Wegs zu erwarten, da er erst nach einigen Stunden nach der MMS-Behandlung auftreten sollte, also zu Zeiten, bei denen die Replikation in MMS-behandelten Zellen schon weitgehend abgeschlossen ist (Abb.4.7, Abb.4.10).

Die Annahme einer geringen Bedeutung von Mus81 nach MMS steht aber im Widerspruch zu Hefe-Studien, die eine Empfindlichkeit Mus81-defizienter Zellen gegenüber MMS und weiteren S-Phase-schädigenden Agenzien wie HU, CPT oder UV-Strahlung beschrieben haben (Interthal + Heyer 2000, Boddy et al. 2001, Doe et al. 2002). Dieses Verhalten scheint auf das Säugersystem aber nicht direkt übertragbar zu sein, denn in Mus81-defizienten Mauszellen wurde zwar eine Empfindlichkeit gegenüber dem *Crosslinker* Mitomycin C nicht aber gegenüber MMS und UV-Strahlung beobachtet (McPherson et al. 2004, Dendouga et al. 2005). Auch für Mus81-defiziente humane Zellen wurde nur eine geringe Sensitivität gegenüber MMS beschrieben (Hiyama et al. 2006). Da die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit Säuger-Zellen durchgeführt wurden, unterstützen diese Studien die Annahme einer weitestgehend Mus81-unabhängigen DSB-Induktion nach MMS.

Die Beobachtung, dass sich eine MMS-bedingte Verzögerung der S-Phase-Progression vor allem während den ersten Stunden nach der MMS-Behandlung manifestiert (Abb.4.7, Abb.4.10), spricht dafür, dass Replikationsgabeln durch methylierte Basen in der Regel nur transient arretiert werden (siehe auch Abschnitt 5.2.2). Reparaturprozesse wie die *translesion synthesis* oder der Vorgang des *lesion bypass* durch *template switching* eröffnen der Zelle effiziente Wege um blockierende Läsionen an der Replikationsgabel zu überwinden. Da bei diesen Prozessen kein DSB erzeugt werden muss, scheinen sie die dominierenden Wege zur Reaktivierung der Replikation an arretierten Replikationsgabeln darzustellen (Heyer et al. 2010). In den letzten Jahren hat sich verstärkt die Meinung etabliert, dass HR-abhängige Prozesse, die durch eine Mus81-abhängige Prozessierung der Replikationsgabel eingeleitet werden, den letzten Ausweg für eine Reaktivierung der Replikation darstellen (Kai et al. 2005). So scheint die Zelle diese Prozesse erst dann einzuleiten, wenn eine Reparatur über andere Mechanismen nicht möglich ist. Dies ist auf zelluläre Regulationsmechanismen zurückzuführen, die Vorgänge wie die TLS oder eine *fork regression* fördern (Prakash et al. 2005) und HR-abhängigen Prozessen aktiv entgegenwirken (Krejci et al. 2003, Veaute et al. 2003). Diese Theorie ist konsistent mit dem späten Auftreten Mus81-abhängiger DSBs nach einer Behandlung mit HU (Hanada et al. 2007).

Zusammengefasst sprechen diese Studien und die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse dafür, dass SSB-unabhängige Prozesse an arretierten Replikationsgabeln kaum zur Ausbildung von γ H2AX-Foci nach MMS beitragen. Weitere Hinweise, welche die Annahme unterstützen, dass MMS-induzierte γ H2AX-Foci an ein-endigen DSBs auftreten, sind in den nächsten Kapiteln aufgeführt.

5.3.2 ATM wird an MMS-induzierte, ein-endige DSBs rekrutiert

Die Annahme, dass MMS-induzierte γ H2AX-Foci durch ein-endige DSBs hervorgerufen werden, wird auch durch Kolokalisationsstudien von γ H2AX-Foci mit anderen DSB-Markern unterstützt. So zeigen etwa 70 % der induzierten γ H2AX-Foci nach MMS eine Kolokalisation mit 53BP1 und der phosphorylierten Form von ATM (pATM) (Nikolova et al. 2010). ATM wird vermittelt über den MRN-Komplex an einen DSB rekrutiert (Lee + Paull 2005) und kann dort eine Reihe unterschiedlicher Substrate wie H2AX phosphorylieren. Dadurch werden u. a. Prozesse eingeleitet, die zu einer Rekrutierung von 53BP1 an den DSB führen (Panier + Durocher 2009), so dass 53BP1 als spezifischer DSB-Marker angesehen wird. Die häufige Kolokalisation von γ H2AX-Foci mit pATM- und 53BP1-Foci ist daher ein deutliches Zeichen, dass dadurch tatsächlich DSBs gekennzeichnet werden und nicht etwa arretierte Replikationsgabeln. Eine solche Kolokalisation MMS-induzierter γ H2AX- und 53BP1-Foci wurde auch in anderen Studien beschrieben (Groth et al. 2010).

Die Kolokalisation von pATM- und γ H2AX-Foci verdeutlicht, dass ATM an die MMS-induzierten, ein-endigen DSBs rekrutiert wird. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Kinase-Abhängigkeit MMS- und strahleninduzierter γ H2AX-Foci legen die Schlussfolgerung nahe, dass ATM dabei in der Lage ist, die Phosphorylierung von H2AX an den ein-endigen DSBs nach einer MMS-Behandlung zu übernehmen. So zeigten ATR-defiziente Fibroblasten selbst nach einer Behandlung mit einem DNA-PK-Inhibitor eine vollständige γ H2AX-Induktion nach MMS (Abb.4.4.B). Hier war die alleinige Aktivität von ATM also ausreichend um die H2AX-Moleküle an den erzeugten ein-endigen DSBs zu phosphorylieren. Ähnliches gilt auch für die DNA-PK, denn ein vergleichbares Ergebnis wurde in ATR-defizienten Zellen auch nach einer Inhibition von ATM erhalten. Nur unter Bedingungen, bei denen alle drei untersuchten Kinasen inaktiviert vorlagen (ATR-defiziente Zellen mit ATM- und DNA-PK-Inhibitor), konnte ein drastischer Rückgang MMS-induzierter γ H2AX-Foci beobachtet werden (Abb.4.4.B). Da ATM und die DNA-PK nicht durch arretierte Replikationsgabeln aktiviert werden (Löbrich et al. 2010), ist die Beteiligung dieser beiden Kinasen an der Ausbildung von γ H2AX-Foci ein weiterer starker Hinweis dafür, dass MMS-induzierte γ H2AX-Foci ein-endige DSBs kennzeichnen. Interessanterweise können Wildtyp-Zellen, die mit dem ATM- und dem DNA-PK-Inhibitor behandelt wurden, ebenfalls die vollständige Anzahl MMS-induzierter γ H2AX-Foci ausbilden (Abb.4.4.B). Die alleinige Aktivität von ATR in diesen Zellen scheint somit auch für die Ausbildung der γ H2AX-Foci ausreichend zu sein. Die Beobachtung, dass die γ H2AX-Foci unter diesen Bedingungen, bei denen nur ATR aktiv ist, deutlich kleiner und schwächer ausgeprägt sind (Daten nicht dargestellt), weist darauf hin, dass ATM und die DNA-PK keine essentielle aber eine unterstützende Funktion bei der Phosphorylierung von H2AX an den ein-endigen DSBs besitzen.

Eine Redundanz der drei untersuchten Kinasen, wie sie also nach MMS aufzutreten scheint, kann aber nicht auf die Ausbildung strahleninduzierter γ H2AX-Foci übertragen werden. Hier

ist die Zahl an γ H2AX-Foci in den Ansätzen, in denen nur ATR aktiv vorliegt, fast auf Hintergrund-Niveau reduziert (Abb.4.4.C). Dadurch wird deutlich, dass strahleninduzierte DSBs zumindest initial kein Substrat für die Aktivierung von ATR darstellen (Stiff et al. 2004). Die beobachtete Aktivierung von ATR an ein-endigen DSBs nach einer MMS-Behandlung könnte auf der Struktur dieser Bruchenden beruhen. Ein-endige DSBs entstehen, wenn ein Arm der Replikationsgabel abfällt, weil die Replikations-Maschinerie auf einen SSB getroffen ist. Es wäre denkbar, dass die unreplizierten Bereiche auf diesem Arm der Replikationsgabel auch auf dem entstandenen ein-endigen DSB einzelsträngig verbleiben und somit ein Substrat für eine ATR-Aktivierung darstellen. Zusammengefasst wäre so ein Modell vorstellbar, bei dem ein Replikations-assoziiertes, ein-endiges DSBs ein Substrat für die Aktivierung aller drei untersuchten Kinasen darstellt.

Eine alternative Interpretation der zuvor beschriebenen Ergebnisse bestünde aber auch darin, dass ATR eine stabilisierende Funktion an arretierten Replikationsgabeln besitzt. Eine solche Funktion von ATR wurde in mehreren Publikationen diskutiert (Zachos et al. 2005). Die Ausbildung eines DSBs und die damit verbundene Aktivierung von ATM und der DNA-PK könnte somit nur die Folge eines Kollabierens von Replikationsgabeln aufgrund einer fehlenden Stabilisierung durch ATR sein. Solch ein Prozess wäre damit rein auf ATR-defiziente Zellen beschränkt und würde unter Bedingungen mit aktivem ATR nicht auftreten. Eine solche Interpretation ist anhand der gewonnenen Daten dieses Experiments zwar möglich, die Vielzahl an Hinweisen für die generelle Ausbildung von ein-endigen DSBs nach MMS lassen sie aber eher unwahrscheinlich erscheinen.

Das Modell, dass die Replikations-assoziierten DSBs nach MMS ein Substrat für alle drei Kinasen darstellen, wird auch dadurch unterstützt, dass unbehandelte S-Phase-Zellen ein vergleichbares Verhalten zeigen. Auch für die während der S-Phase spontan auftretenden γ H2AX-Foci, die ebenfalls auf Störungen während der Replikation zurückzuführen sind, konnte eine Redundanz von ATM, ATR und der DNA-PK beobachtet werden. Analog zur Situation nach MMS trat eine Reduktion der Zahl an spontanen γ H2AX-Foci nur unter Bedingungen auf, bei denen alle drei Kinasen inaktiviert waren (Abb.4.4.A). Damit scheinen sowohl spontane als auch MMS-induzierte γ H2AX-Foci auf ähnliche Prozesse zurückzuführen zu sein.

5.3.3 Detektion MMS-induzierter, ein-endiger DSBs mit alternativen Methoden

Die γ H2AX-Immunfluoreszenz ist eine indirekte Methode zur Messung von DSBs, da mit der H2AX-Phosphorylierung nicht der DSB selbst sondern nur eine durch den DSB ausgelöste zelluläre Reaktion detektiert wird. Gerade die Tatsache, dass eine Phosphorylierung von H2AX auch durch einzelsträngige DNA-Bereiche an arretierten Replikationsgabeln ausgelöst werden kann, ist ein kritischer Punkt dieser Methode (Löbrich et al. 2010). Auch wenn die

zuvor ausgeführten Punkte die Annahme bestärken, dass die MMS-induzierten γ H2AX-Foci tatsächlich DSBs kennzeichnen, wäre eine Bestätigung dieser Aussage durch γ H2AX-unabhängige Methoden sinnvoll. Leider sind viele technische Ansätze zur direkten DSB-Messung wie chromosomale Studien oder die Pulsfeld-Gelelektrophorese nicht auf die S-Phase übertragbar oder besitzen andere Limitierungen.

Brüche der DNA können auf Ebene kondensierter Chromosomen sichtbar gemacht werden. Dies wird durch die Analyse mitotischer Chromosomen möglich, da das Chromatin während der Mitose im höchst möglichen Kondensierungszustand vorliegt. Darüber hinaus ermöglicht die Methode der *premature chromosome condensation* (PCC), bei der eine künstliche Kondensation des Chromatins durch eine Behandlung mit Calyculin A erreicht wird, eine Analyse chromosomaler Aberrationen in der G2-Phase und in der G0/G1-Phase (Gotoh + Durante 2006). Für Zellen in der S-Phase kann diese Methode jedoch nicht angewandt werden. Die in S-Phase-Zellen vorhandenen unreplizierten DNA-Bereiche und die Stellen mit aktiven Replikationsgabeln können auch durch eine Behandlung mit Calyculin A nicht in dem Maße kondensiert werden, dass sie mikroskopisch in Form der typische Chromatidstruktur sichtbar werden. Dadurch ergibt sich ein charakteristisches Bild in der S-Phase kondensierter Chromosomen, das häufig als „pulverisiert“ bezeichnet wird und das eine sichere Abschätzung der chromosomalen Schädigung unmöglich macht (Gotoh + Durante 2006).

Ein klassischer Ansatz zur Untersuchung der Induktion und der Reparatur von DSBs ist die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE). Diese rein physikalische Methode beruht auf einer gelelektrophoretischen Messung der DSB-bedingten Fragmentierung der DNA (Illiakakis et al. 1991). Über viele Jahre war diese Methode ein Standardverfahren für Untersuchungen strahleninduzierter DSBs (Löbrich et al. 1993, Rothkamm + Löbrich 2003). Eine Problematik der PFGE liegt aber in der experimentellen Durchführung, bei der die Zellen Temperaturen von über 40 °C ausgesetzt werden. Verschiedene DNA-Schäden (z. B. SSBs oder Basenschäden) sind nicht stabil genug, um solche hohen Temperaturen zu tolerieren. An diesen DNA-Schäden, die als *heat labile sites* bezeichnet werden, werden durch die Erhitzung der Proben DSBs ausgebildet, die als Artefakt in die Messung mit eingehen. Die Problematik dieser *heat labile sites* ist bei einer MMS-Behandlung besonders relevant, da durch MMS eine Vielzahl an SSBs erzeugt wird (Groth et al. 2010). Zwar haben einige PFGE-Studien eine Induktion von DSBs nach MMS beschrieben (Choy + Kron 2002), eine neuere Studie konnte aber belegen, dass es sich hierbei hauptsächlich um Artefakte handelte, die auf SSBs zurückzuführen sind (Lundin et al. 2005). Dieses Ergebnis ist aber nicht gleichzusetzen mit der Aussage, dass durch MMS keine DSBs erzeugt würden. Bei der auch in der vorliegenden Arbeit beobachteten, relativ geringen Zahl an induzierten DSBs nach MMS erscheint es plausibel, dass die Methode der PFGE zu insensitiv für eine Detektion dieser Schäden ist.

Aufgrund dieser Limitationen der PFGE und chromosomaler Analysen während der S-Phase stellt die γ H2AX-Immunfluoreszenzanalyse somit die beste Methode zur Untersuchung MMS-induzierter DSBs in der S-Phase dar.

5.4 Charakterisierung der γ H2AX-Reparaturkinetiken nach MMS

Die in dieser Arbeit angewandte Kombination einer γ H2AX-Immunfärbung mit einer Markierung replizierender Zellen mittels BrdU ermöglichte nicht nur eine S-Phase-spezifische Untersuchung des γ H2AX-Induktionsverhaltens nach MMS, auch das Reparaturverhalten der MMS-induzierten γ H2AX-Foci konnte mit diesem Ansatz verfolgt werden. Die 1-stündige Pulsmarkierung mit BrdU ermöglichte dabei die Identifizierung der Zellen, die sich zur Zeit der MMS-Behandlung in der S-Phase befanden. Diese Zellpopulation konnte anschließend über mehrere Stunden durch den Zellzyklus (bis in die Mitose) verfolgt werden. Anhand der dabei ermittelten Kinetiken der Ausbildung und Reparatur an γ H2AX-Foci konnten Rückschlüsse zum Reparaturverhalten MMS-induzierter DSBs getroffen werden.

Die ersten Reparaturkinetiken nach MMS wurden in humanen Wildtyp-Fibroblasten nach Behandlung mit unterschiedlichen MMS-Konzentrationen erstellt. Die ermittelten γ H2AX-Kinetiken zeigten dabei einen charakteristischen, biphasischen Verlauf, der sich deutlich von Reparaturkinetiken strahleninduzierter DSBs unterschied. In den ersten Stunden nach der MMS-Behandlung wurde eine Zunahme an γ H2AX-Foci beobachtet (Abb.4.5.B). Dieser Anstieg der γ H2AX-Zahl verdeutlicht, dass die DSB-Induktion nach der akuten MMS-Behandlung noch nicht abgeschlossen ist. Zwar werden nur während der 1-stündigen MMS-Behandlung Basenmethylierungen induziert, diese können aber z. T. über Stunden in der DNA persistieren (Osborn + Phillips 2000). Dadurch stellen sie auch noch über einen längeren Zeitraum ein potentiell Risiko für eine Störung der Replikationsgabel dar. Während der ersten Stunden nach der MMS-Behandlung werden daher ständig neue DSBs erzeugt, wenn Replikationsgabeln mit SSBs interferieren, die während der Reparatur der methylierten Basen induziert werden. Solange die Replikation in einer Zelle nicht abgeschlossen ist, können solche Prozesse auftreten. Daher ist eine Abnahme an MMS-induzierten γ H2AX-Foci erst dann zu erwarten, wenn die DNA weitgehend repliziert wurde und die DSB-Reparaturprozesse über die Induktion neuer DSBs überwiegen können. Die in Abb.4.5.B dargestellten γ H2AX-Kinetiken verdeutlichen, dass dieser Zeitpunkt von der applizierten MMS-Konzentration abhängig ist. So wurde nach Behandlung mit der niedrigsten eingesetzten MMS-Konzentration von 0,5 mM schon zwischen 2 h und 4 h ein Maximum an γ H2AX-Foci erreicht. Danach überwogen die Reparaturprozesse und die Anzahl an γ H2AX-Foci sank kontinuierlich ab. Im Gegensatz dazu wurde das γ H2AX-Maximum nach 1,5 oder 2,5 mM erst nach 4 h bzw. 6 h erreicht (Abb.4.5.B), was dafür spricht, dass die Replikation nach diesen MMS-Konzentrationen erst später abgeschlossen war.

In der Tat konnte eine zeitliche Korrelation der γ H2AX-Induktion nach MMS mit dem Fortschreiten der Replikation anhand durchflusszytometrischer Analysen bestätigt werden. So wurde mit steigender MMS-Konzentration eine stärkere Verzögerung der S-Phase-Progression detektiert (Abb.4.7.A). Darüber hinaus verdeutlicht ein Vergleich des Zellzyklusverhaltens mit den erstellten γ H2AX-Kinetiken, dass eine beginnende Reparatur auf γ H2AX-

Ebene immer zu einem Zeitpunkt beobachtet wird, an dem die Replikation weitgehend abgeschlossen ist. Ab diesem Zeitpunkt scheinen die Reparaturereignisse zu überwiegen. Wann dieser Zeitpunkt erreicht wird, ist dabei nicht nur von der eingesetzten MMS-Konzentration abhängig. Auch generelle Unterschiede im Zellzyklusverhalten unterschiedlicher Zelllinien können diesen Zeitpunkt und das biphasische Verhalten der γ H2AX-Kinetiken beeinflussen. So ist zum Beispiel der Anstieg an γ H2AX-Foci nach einer MMS-Behandlung in der Hamsterzelllinie AA8 nur sehr schwach ausgeprägt (Abb.4.13.A), was auf die schnelle Proliferation dieser Zellen zurückzuführen sein könnte.

Ab dem Zeitpunkt nach der MMS-Behandlung, ab dem sich die Reparaturprozesse manifestieren, scheinen auch kaum noch neue DSBs erzeugt zu werden. Dies wird anhand des Reparaturverhaltens HR-defizienter Zellen deutlich. Nach dem Zeitpunkt, bei dem die korrespondierende Wildtyp-Linie ein γ H2AX-Maximum erreicht hat, wird in HR-defizienten Zellen, in denen die MMS-induzierten DSBs unrepariert verbleiben, nur noch eine geringe Zunahme der γ H2AX-Foci detektiert (Abb.4.11.A, Abb.4.13.A). Würde es in diesen Zellen auch zu so späten Zeiten noch zu einer starken Ausbildung von DSBs kommen, müsste sich dies in den γ H2AX-Kinetiken in Form eines stärkeren Anstiegs widerspiegeln.

Die verzögerte Ausbildung von γ H2AX-Foci nach einer MMS-Behandlung könnte alternativ aber auch über einen anderen Mechanismus erklärt werden. Falls ein DSB nicht direkt zu dem Zeitpunkt ausgebildet würde, wenn eine Replikationsgabel auf einen SSB trifft, und die Replikationsgabel erst nach einiger Zeit kollabieren würde, wäre ebenfalls eine langsame Zunahme an γ H2AX-Foci zu erwarten. Gegen einen solchen Prozess spricht aber, dass ein Großteil der induzierten γ H2AX-Foci schon direkt nach der MMS-Behandlung detektiert wird. Dies unterstützt das Modell einer schnellen Ausbildung ein-endiger DSBs, wenn eine Replikationsgabel mit einem SSB interferiert. Die Annahme, dass die anhaltende γ H2AX-Induktion auf persistierende Basenmethylierungen zurückzuführen ist, wird auch durch Beobachtungen bekräftigt, dass Zellen selbst nach mehreren Stunden nach der MMS-Behandlung noch γ H2AX-Foci ausbilden können. Wie in Abb.4.3 verdeutlicht, ist eine γ H2AX-Induktion zu einem frühen Zeitpunkt nach einer MMS-Behandlung auf Zellen in der S-Phase beschränkt. In BrdU-negativen G1- und G2-Zellen treten dagegen keine zusätzlichen γ H2AX-Foci auf. Mit zunehmender Beobachtungszeit kann aber auch eine steigende Zahl BrdU-negativer Zellen mit stark erhöhtem Foci-Level detektiert werden. Durch eine abgewandelte Variante des γ H2AX/BrdU-Ansatzes, bei dem die BrdU-Markierung erst einige Stunden nach der MMS-Behandlung erfolgte, konnte bestätigt werden, dass es sich hierbei um Zellen handelte, die erst nach der MMS-Behandlung mit der Replikation begannen (Daten nicht dargestellt). Somit haben selbst in der G1-Phase erzeugte Basenmethylierungen das Potenzial zu einem späteren Zeitpunkt Replikations-abhängige DSBs auszubilden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die durch MMS-induzierten Basenmethylierungen aufgrund ihrer teilweise sehr langen Halbwertszeiten (Osborn + Phillips 2000) über mehrere Stunden ein Risiko für die Ausbildung ein-endiger DSBs darstellen. Die

nach MMS-Behandlung erstellten γ H2AX-Reparaturkinetiken spiegeln dies in einem biphasischen Verhalten wider, das auf die gegenläufigen Prozesse von Induktion und Reparatur von γ H2AX-Foci zurückzuführen ist. Ein ähnliches Verhalten wurde auch schon in früheren Studien beschrieben, bei denen die Induktion von DSBs nach MMS mit Hilfe des Comet-Assays gemessen wurde. Auch mit dieser Methode wurde ein Gleichgewicht von Ausbildung und Reparatur der DSBs beobachtet (Horton et al. 2008).

5.5 MMS-induzierte DSBs werden über den Weg der HR repariert

Schon seit Jahren wird der HR eine entscheidende Funktion bei der Reparatur MMS-induzierter DNA-Schäden zugeschrieben. Diese Meinung beruht vor allem auf zahlreichen Überlebensstudien, die eine starke Empfindlichkeit HR-defizienter Zelllinien gegenüber einer Behandlung mit MMS oder anderen Alkylanzien beschrieben haben (Lundin et al. 2005, Smiraldo et al. 2005, Hinz et al. 2006). Darüber hinaus kann nach einer Behandlung mit unterschiedlichen Alkylanzien eine hohe Frequenz an SCEs detektiert werden, die einen messbaren Endpunkt von HR-Prozessen darstellen (Kaina 2004). Ein Hauptziel dieser Arbeit war es diese große Bedeutung der HR nach MMS auch anhand der hier etablierten Methode der S-Phase-spezifischen γ H2AX-Immunfluoreszenz zu bestätigen. Durch den Vergleich unterschiedlicher HR- und NHEJ-defizienter Zelllinien sollte dabei eine genaue Abschätzung der Bedeutung dieser beiden Prozesse für die Reparatur MMS-induzierter Schäden getroffen werden.

5.5.1 Analyse MMS-induzierter γ H2AX-Foci in HR- und NHEJ-defizienten Zellen

Konsistent mit der beschriebenen Hypersensitivität von HR-Mutanten konnte auch auf γ H2AX-Ebene eine essentielle Bedeutung der HR nach einer MMS-Behandlung nachgewiesen werden. In unterschiedlichen Zellsystemen wurde ein sehr starker γ H2AX-Reparaturdefekt in HR-defizienten Zellen detektiert (Abb.4.11, Abb.4.13, Abb.4.14). Dabei waren die γ H2AX-Kinetiken in diesen Zelllinien in den ersten Stunden nach der MMS-Behandlung weitgehend vergleichbar mit den Kinetiken der korrespondierenden Wildtyp-Linien. Erst zu Zeiten, wenn die Ausbildung dieser Schäden abgeschlossen war und die Zahl an γ H2AX-Foci in Wildtyp-Zellen abnahm, begann sich ein HR-Reparaturdefekt zu manifestieren.

Der deutlichste Defekt wurde dabei in den beiden HR-defizienten Hamsterzelllinien *irs1SF* und *51D1* beobachtet. Hier war über die gesamte Untersuchungsdauer kein Rückgang in der Zahl an γ H2AX-Foci zu erkennen (Abb.4.13.A). In der humanen Fibroblasten-Linie *HSC62*, die eine hypomorphe Mutation im *BRCA2*-Gen besitzt (Howlett et al. 2002), wurde ebenfalls

ein deutlicher Defekt nachgewiesen. Zwar wurde in diesen Zellen auch eine langsame Reparatur beobachtet (Abb.4.11.A), diese kann aber auf den hypomorphen Charakter der Mutation zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu den untersuchten HR-Mutanten konnte keine Beteiligung des NHEJ-Wegs an der Reparatur MMS-induzierter DSBs nachgewiesen werden. Sowohl in der LigIV-defizienten, humanen Zelllinie 180BR (Abb.4.11.A) als auch in der Ku80-defizienten Hamsterlinie XRS-6 (Abb.4.13.B) wurde keinerlei Beeinträchtigung in der Reparaturkapazität nach einer MMS-Behandlung detektiert. Lediglich die γ H2AX-Kinetiken von DNA-PKcs-defizienten V3-Zellen zeigten einen erkennbaren Unterschied im Vergleich zu ihrer komplementierten Wildtyp-Linie (V3-WT). Dieser bestand vor allem in einer leicht erhöhten Zahl an ausgebildeten γ H2AX-Foci (Abb.4.13.A), die vielleicht durch unterschiedliche Zellzyklus-Eigenschaften von V3- und V3-WT-Zellen erklärt werden könnte. Die Rate der anschließenden Reparatur war aber in beiden Zelllinien vergleichbar, so dass dieses Verhalten nicht als Reparaturdefekt zu werten ist. Die erhaltenen Ergebnisse für HR- und NHEJ-defiziente Zelllinien konnte auch mit Hilfe der RNAi-Technik in humanen Tumorzellen bestätigt werden. Eine Depletion wichtiger HR-Faktoren wie BRCA2 oder Rad51 resultierte hier in einem sehr starken Reparaturdefekt, während eine gemeinsame Depletion von Ku80 und der DNA-PKcs keinen Einfluss auf die γ H2AX-Zahl hatte (Abb.4.14).

Ein Teil der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kaina von der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz durchgeführt und bereits publiziert (Nikolova et al. 2010). Während ich dabei die DNA-schädigende Wirkung von MMS auf der Ebene von γ H2AX-Foci mit begleitenden Zellzyklus-Studien analysierte, untersuchte die Arbeitsgruppe von Prof. Kaina die Wirkung von MMS anhand von Endpunkten wie zellulärem Überleben, Apoptose oder chromosomalen Aberrationen. Konsistent mit der bereits zuvor beschriebenen Hypersensitivität HR-defizienter Zelllinien gegenüber alkylierenden Agenzien (Smiraldi et al. 2005, Hinz et al. 2006) konnten sie dabei auch eine starke Empfindlichkeit der in dieser Arbeit untersuchten HR-Mutanten gegenüber MMS nachweisen. Diese Beobachtung konnte zudem durch den Nachweis einer starken Apoptose-Rate in diesen Zelllinien bestätigt werden. Die Untersuchung verschiedener NHEJ-defizienter Zelllinien ergaben dagegen nur eine schwache Empfindlichkeit gegenüber MMS und eine geringe Zunahme der Apoptose-Rate (Nikolova et al. 2010).

Diese Ergebnisse und der in dieser Arbeit detektierte, fast vollständige γ H2AX-Reparaturdefekt HR-defizienter Zellen bestärken die Annahme, dass die durch MMS hervorgerufenen DSBs ausschließlich über den HR-Weg repariert werden, während der Weg des NHEJ nichts zur Reparatur dieser Schäden beiträgt. Eine solche Determinierung der MMS-induzierten DSBs für den HR-Weg erscheint plausibel, da durch MMS Replikations-abhängige, ein-endige DSBs erzeugt werden. Da diesen DSBs ein zweites Bruchende fehlt, ist eine direkte Ligation mit einem passenden Bindepartner nicht möglich. Eine Reparatur dieser ein-endigen DSBs über den NHEJ-Weg ist sogar von Nachteil, da dies in der Fehlverknüpfung von zwei

unterschiedlichen Bruchenden resultiert. Solche Prozesse führen zur Ausbildung chromosomaler Aberrationen wie z. B. triradialen Chromosomen oder Ring-Chromosomen. Solche Fusionen auf chromosomaler Ebene können auch in der Tat vermehrt unter Bedingungen einer HR-Defizienz detektiert werden. Unter diesen Bedingungen scheinen falsche NHEJ-Prozesse abzulaufen, die in HR-profizienten Zellen unterdrückt sind (Nikolova et al. 2010, Bunting et al. 2010, Schlacher et al. 2011).

Der klassische Weg, der für eine Reparatur ein-endiger DSBs postuliert wurde, ist die *break-induced replication* (BIR). Bei diesem HR-Vorgang vollzieht der ein-endige DSB eine Strang-invasion in den komplementären Bereich des intakten DNA-Doppelstrangs, wobei ein D-Loop erzeugt wird (siehe Abb.2.10). Aus diesem D-Loop heraus kann nun die Struktur einer funktionalen Replikationsgabel ausgebildet werden, an der die Replikation re-initiiert werden kann (Paques + Haber 1999). Eine neuere Studie, in der die Reaktivierung der Replikation nach einer Behandlung mit HU anhand des *DNA fibre assay* untersucht wurde, zeigt aber noch einen zweiten Reparatur-Mechanismus für ein-endige DSBs auf (Petermann et al. 2010). Mit diesem technischen Ansatz konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der durch eine HU-Behandlung kollabierten Replikationsgabeln die Replikation nicht wieder aufnimmt, wie es bei einem BIR-Vorgang zu erwarten wäre. Stattdessen wurde ein deutlicher Anstieg neuer Replikationsereignisse in der Nähe der kollabierten Replikationsgabeln detektiert. Daraus wurde auf eine gezielte Initiation von Replikationsvorgängen an den Replikationsursprüngen geschlossen, die benachbart zu der Stelle der kollabierten Replikationsgabel liegen. Schreitet eine neu-initiierte Replikationsgabel nun bis zum Ort des ein-endigen DSBs fort, wird dadurch ein zweites, passendes Bruchende geschaffen (Abb.2.11), welches dann eine BIR-unabhängige Reparatur des ein-endigen Bruchs ermöglicht, was theoretisch über den HR- oder den NHEJ-Weg erfolgen könnte (Petermann et al. 2010).

Zwar wurde dieses Modell noch nicht für MMS-induzierte DSBs bestätigt, dennoch kann solch ein Mechanismus der Reparatur über die gezielte Erzeugung eines passenden, zweiten Bruchendes auch hier angenommen werden. Tritt dieser Prozess nach MMS tatsächlich auf, machen die in dieser Arbeit erstellten γ H2AX-Kinetiken aber deutlich, dass auch hier die abschließende Reparatur ausschließlich über einen HR-Weg abläuft. Trotz des vorhandenen zweiten Bruchendes kann das NHEJ anscheinend nichts zur Reparatur dieser DSBs beitragen. Dies könnte zum Beispiel auf die starke Resektion der MMS-induzierten DSBs zurückzuführen sein. Der initiale Faktor des NHEJ ist das Ku70/Ku80-Heterodimer, welches sich innerhalb von wenigen Sekunden nach der Erzeugung eines DSBs an diesen anlagert (Uematsu et al. 2007). Das Heterodimer bindet dabei aber an doppeltsträngige DNA-Enden. Zwar ist auch eine Anlagerung von Ku70/Ku80 an kurze, einzelsträngige Überhänge möglich (Wetering + Chen 2008) und es kann auch während dem NHEJ zu kurzen Resektions-Prozessen kommen (Barlow et al. 2008, Yun + Hiom 2009), die hier auftretenden Bereiche einzelsträngiger DNA sind aber nicht vergleichbar mit den langen ssDNA-Bereichen, die während der HR auftreten (Mimitou + Symington 2009). Es erscheint plausibel, dass die

durch MMS erzeugten ein-endigen DSBs ebenfalls stark resektiert werden, um sie HR-Prozessen (z. B. der BIR) zuzuführen. Dies könnte der Affinität des Ku-Heterodimers für das Bruchende entgegenwirken, so dass der NHEJ-Weg, selbst wenn ein zweites Bruchende erzeugt wurde, bereits initial gehemmt ist. Darüber hinaus wurden vor Kurzem weitere zelluläre Prozesse postuliert, die NHEJ-Vorgängen an Replikations-assoziierten DSBs entgegenwirken um diese DSBs gezielt dem HR-Weg zuzuführen (Bunting et al. 2010).

Der NHEJ-Weg könnte somit an ein-endigen DSBs also gezielt unterdrückt werden. Eine solche Annahme ist konsistent mit den in der vorliegenden Arbeit beobachteten γ H2AX-Reparaturverhalten HR- und NHEJ-defizienter Zellen, denn hier wurden selbst unter Bedingungen einer HR-Defizienz keine erkennbaren NHEJ-Vorgänge beobachtet. Allerdings wäre es nicht auszuschließen, dass solche NHEJ-Prozesse aufgrund des biphasischen Verhaltens der γ H2AX-Kinetiken nach MMS übersehen werden. Reparaturstudien strahlen-induzierter DSBs verdeutlichen, dass das NHEJ ein schneller Prozess ist, der innerhalb weniger Stunden nach der Bestrahlung abgeschlossen ist (Beucher et al. 2009, Jeggo et al. 2011). Wenn auch bei MMS-induzierten DSBs solch schnelle NHEJ-Prozesse in den ersten Stunden nach der MMS-Behandlung ablaufen würde, könnten sie von der anhaltenden Induktion neuer DSBs überlagert werden. Um diese Möglichkeit auszuschließen wurde das γ H2AX-Reparaturverhalten nach MMS auch unter Bedingungen untersucht, bei denen weder HR noch NHEJ ablaufen konnten. Dies wurde durch eine Behandlung von HR-defizienten Zellen mit einem spezifischen Inhibitor der DNA-PK erreicht. Die zusätzliche Inhibition der DNA-PK hatte aber keinen additiven Effekt auf das γ H2AX-Level zur Folge (Abb.4.15). Dies unterstützt die Annahme dass nach einer MMS-Behandlung keine NHEJ-Prozesse an der Reparatur der ein-endigen DSBs beteiligt sind.

Die Hypothese einer komplett NHEJ-unabhängigen Reparatur nach MMS steht aber nicht im Einklang mit Studien, die eine leichte Empfindlichkeit NHEJ-defizienter Zellen gegenüber Akyllanzien beschrieben haben (Zdzienicka et al. 1988, Lundin et al. 2005). Auch in den Überlebensstudien meiner Kooperationspartnern an der Universität in Mainz zeigten die untersuchten NHEJ-Mutanten eine leichte Empfindlichkeit (Nikolova et al. 2010). Der große Unterschied klassischer Überlebensexperimente zur der in dieser Arbeit angewandten γ H2AX-Analyse besteht darin, dass sie lediglich Aussagen über das Verhalten der gesamten Zellpopulation erlauben. Zellzyklus-abhängige Effekte können dagegen nicht gemessen werden. Durch den Einsatz der Zellzyklus-spezifischen γ H2AX-Immunfluoreszenz konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MMS im untersuchten Konzentrationsbereich γ H2AX-Foci fast ausschließlich während der S-Phase ausbildet (Abb.4.3). Dennoch können auch in der G1- und G2-Phase MMS-induzierte γ H2AX-Foci auftreten, die auf einen Replikations-unabhängigen Prozess zurückzuführen sind (siehe Abb.5.1). Die Reparatur durch MMS außerhalb der S-Phase erzeugter DSBs wurde in diese Arbeit jedoch nicht untersucht. Gerade für die DSBs, die in der G1-Phase ausgebildet werden, kann eine Beteiligung des NHEJ an der Reparatur angenommen werden. Daher ist es denkbar, dass die leichte Empfind-

lichkeit NHEJ-defizienter Zelllinien auf MMS-induzierte DSBs zurückzuführen ist, die Replikations-unabhängig entstanden sind und über den NHEJ-Weg repariert werden müssen.

5.5.2 Analyse von Rad51-Foci nach Behandlung mit MMS

Ein Indikator für HR-Ereignisse sind Rad51-Foci. Daher wurde in einigen Ansätzen dieser Arbeit neben γ H2AX-Foci auch die Ausbildung von MMS-induzierten Rad51-Foci untersucht. Wie erwartet konnte nach einer MMS-Behandlung eine deutliche Induktion an Rad51-Foci beobachtet werden. Diese Foci kolokalisierten mit γ H2AX-Foci (Abb.4.5.A), was verdeutlicht, dass sie an den gleichen DNA-Schäden ausgebildet werden. Im Vergleich zu den erhaltenen γ H2AX-Reparaturkinetiken zeigten die Rad51-Kinetiken einen ähnlichen Verlauf, der ebenfalls ein biphasisches Verhalten aufwies. Die Zahl an Rad51-Foci stieg dabei in der Regel bis zu dem Zeitpunkt an, an dem auch die maximale Anzahl an γ H2AX-Foci ausgebildet wurde. Danach nahm das Rad51-Level langsam ab, was im Vergleich zu den γ H2AX-Kinetiken aber etwas schneller erfolgte (Abb.4.5.B+C).

Obwohl die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Studien deutlich machten, dass alle MMS-induzierten Schäden über HR-Wege repariert werden, konnten dennoch nicht an allen γ H2AX-Foci auch Rad51-Foci nachgewiesen werden. Bei allen untersuchten MMS-Konzentrationen wurden nur etwa halb so viele Rad51-Foci wie γ H2AX-Foci detektiert (Abb.4.5). Dies ist darauf zurückzuführen, dass Rad51-Foci im Gegensatz zu γ H2AX-Foci lediglich ein temporäres Intermediat der HR kennzeichnen. H2AX wird innerhalb von wenigen Minuten nach dem Auftreten eines DSBs phosphoryliert und behält diese Modifikation bis zu einem Zeitpunkt, wenn die Reparatur des DSBs abgeschlossen und die ursprüngliche Chromatin-Struktur wiederhergestellt ist (Kinner et al. 2008). Die Anlagerung von Rad51 an die DNA wird dagegen erst nach der Resektion der Bruchenden möglich. Durch den relativ langsamen Prozess der Resektion bilden sich Rad51-Foci ebenfalls langsam aus. Dies führt dazu, dass auch in bestrahlten G2-Zellen die maximale Zahl an Rad51-Foci erst 2 h nach der Schadens-Induktion beobachtet wird (Beucher et al. 2009). Während mit der Resektion der Parameter identifiziert ist, der die Ausbildung von Rad51-Foci bestimmt, ist nicht genau geklärt, bis zu welchem Schritt des HR-Prozesses das angelagerte Rad51 als Focus detektierbar bleibt. Nach der Stranginvasion muss das Rad51-Nukleoproteinfilament wieder abgebaut werden, damit die DNA-Synthese an dem eingewanderten Bruchende beginnen kann (Heyer et al. 2006). Spätestens zu diesem Zeitpunkt im HR-Vorgang sollten die Rad51-Foci also aufgelöst werden. Die Annahme, dass späte HR-Prozesse nicht mehr durch Rad51-Foci gekennzeichnet werden, würde auch den im Vergleich zu den γ H2AX-Kinetiken stärkeren Rückgang der Zahl an Rad51-Foci nach langen Reparaturzeiten erklären.

Die im Vergleich zu γ H2AX-Foci geringere Zahl induzierter Rad51-Foci scheint somit auf den temporären Charakter dieser Strukturen zurückzuführen sein. Zwar ist anzunehmen, dass

alle MMS-induzierten γ H2AX-Foci zu irgendeinem Zeitpunkt auch Rad51-positiv vorliegen, jedoch kann dies mit der hier eingesetzten Immunfluoreszenz-Methode mit fixierten Zellen nicht überprüft werden, da hier immer nur eine Momentaufnahme der Zelle analysiert wird. Alternativ zu diesem Erklärungsansatz könnte man aber auch postulieren, dass ein Teil der γ H2AX-Foci keine Rad51-Foci ausbildet. Für HU-behandelte Zellen wurden zwei unterschiedliche Rad51-abhängige Reparaturwege beschrieben, von denen aber nur ein Weg mit sichtbaren Rad51-Foci assoziiert ist (Petermann + Helleday 2010). Dabei handelt es sich um einen HR-abhängigen Prozess zur Reparatur ein-endiger DSBs an kollabierten Replikationsgabeln, wie er auch nach einer MMS-Behandlung ablaufen sollte. An arretierten Replikationsgabeln (nach kurzzeitigen HU-Behandlungen) treten dagegen Reaktivierungsprozesse auf, bei denen kein DSB erzeugt wird. Durch den experimentellen Ansatz der Co-Immunpräzipitation konnte Rad51 auch an diesen arretierten Replikationsgabeln nachgewiesen werden, auch wenn hier keine sichtbaren Rad51-Foci auftraten. Zudem wurde in Rad51-depletierten Zellen eine verminderte Reaktivierungs-Rate der arretierten Replikationsgabeln beobachtet, weshalb auf eine wichtige Funktion von Rad51 an diesen Prozessen (z. B. beim Vorgang der *fork regression*) geschlossen wurde (Petermann + Helleday 2010). Man könnte nun spekulieren, dass solch ein Rad51-abhängiger Reaktivierungsprozess, der aber nicht mit Rad51-Foci assoziiert ist, auch nach MMS auftritt. Dies sollte aber nur an arretierten Replikationsgabeln der Fall sein. Da davon auszugehen ist, dass diese Strukturen nicht zur Ausbildung von γ H2AX-Foci führen (siehe auch Kapitel 5.3), würden solche Prozesse aber nicht in die Analyse von γ H2AX- und Rad51-Foci eingehen.

Daher erscheint die Erklärung plausibler, dass immer nur ein Teil der tatsächlich ausgebildeten Rad51-Foci detektiert wird. Unterstützt wird diese Annahme auch durch das Reparaturverhalten strahleninduzierter Rad51-Foci in der G2-Phase. Auch hier werden in den Zellen maximal halb so viele Rad51-Foci detektiert wie γ H2AX-Foci (Beucher et al. 2009). Trotz dieser Einschränkung stellen Rad51-Foci dennoch einen guten Indikator für HR-Ereignisse dar, was auch dadurch verdeutlicht wird, dass in den untersuchten HR-defizienten Zellen dieser Arbeit fast keine Rad51-Foci nachgewiesen wurden (Abb.4.11).

5.5.3 Bestätigung der HR-Abhängigkeit MMS-induzierter DSBs auf chromosomaler Ebene

Die Abhängigkeit der Reparatur MMS-induzierter DSBs vom HR-Prozess kann auch auf chromosomaler Ebene nachgewiesen werden. So zeigen HR-defiziente Zellen schon nach geringen MMS-Konzentrationen eine Vielzahl chromosomaler Aberrationen wie Chromatid-Brüche oder radiale Strukturen (Nikolova et al. 2010). Chromatid-Brüche stellen dabei die Folge des Reparaturdefekts dieser Zellen für die durch MMS erzeugten, ein-endigen DSBs dar. Chromosomale Fusionen (z. B. in Form von radialen Chromosomen-Strukturen) sind da-

gegen auf Fehlverknüpfungen von ein-endigen Brüchen infolge inkorrektter NHEJ-Vorgänge zurückzuführen, welche bei einer HR-Defizienz mit schwacher Frequenz ablaufen (Bunting et al. 2010).

Auf chromosomaler Ebene kann zudem auch ein Endpunkt der HR in Form von SCEs gemessen werden. Ähnlich wie andere S-Phase-schädigende Stoffe wurde auch MMS als ein stark SCE-induzierendes Agens beschrieben (Kaina 2004). Auch in den Studien meiner Kooperationspartner wurde eine Konzentrations-abhängige Induktion von SCEs nach MMS in Wildtyp- und NHEJ-defizienten Zellen beobachtet, während in HR-Mutanten fast keine SCEs nachgewiesen wurden (Nikolova et al. 2010). Die SCE-induzierende Wirkung von MMS wurde auch innerhalb unserer Arbeitsgruppe bestätigt. Dabei wurde nach einer Behandlung mit 1,5 mM MMS ein durchschnittlicher Wert von etwa 30 SCEs pro Metaphase ermittelt (persönliche Mitteilung Dr. Sandro Conrad).

Die Detektion dieser hohen Zahl an SCEs bestätigt zwar das Auftreten von HR-Prozessen nach einer MMS-Behandlung, jedoch können die SCEs nicht eindeutig mit den MMS-induzierten γ H2AX-Foci korreliert werden. So können zwar alle HR-Prozesse, die an den durch γ H2AX-Foci gekennzeichneten, ein-endigen DSBs ablaufen (BIR oder HR nach der replikativen Erzeugung eines zweiten Bruchendes), zur Ausbildung von SCEs führen (siehe Abb.2.10), jedoch sind auch SCE-assoziierte Prozesse an den durch methylierte Basen transient arretierten Replikationsgabeln möglich. Diese Replikations-Arreste, die nicht als γ H2AX-Foci sichtbar werden, können durch unterschiedliche Prozesse überwunden werden. Zwar geht man davon aus, dass der SCE-freie Weg der *translesion synthesis* den dominierenden Weg zur Überwindung einer Replikations-Blockade darstellt (Heyer et al. 2010), dennoch können auch Prozesse wie eine *fork regression* oder Reaktivierungsvorgänge an einzelsträngigen Bereichen auf dem Folgestrang der Replikationsgabel ablaufen (Heller + Marians 2006). Diese Prozesse können theoretisch auch zur Ausbildung von SCEs nach einer MMS-Behandlung beitragen (siehe auch Abb.2.8 + Abb.2.9).

Eine quantitative Abschätzung des Beitrags dieser einzelnen Prozesse an der SCE-Induktion nach MMS ist sehr schwierig. Eine Studie, in der die SCE-Level in Pol β - und AAG-defizienten Mauszellen nach Behandlung mit MMS bestimmt wurden, befürwortet aber die Annahme, dass der Einfluss ein-endiger DSBs auf die SCE-Induktion deutlich größer ist. So zeigten Pol $\beta^{-/-}$ -Zellen eine deutlich stärkere SCE-Induktion als Wildtypzellen. AAG $^{-/-}$ -defiziente Zellen, die keine BER einleiten, bildeten SCEs dagegen nur etwa auf Wildtyp-Niveau aus (Sobol et al. 2003). Ob die SCEs nach einer MMS-Behandlung wirklich hauptsächlich den HR-Prozessen an ein-endigen DSBs zuzuschreiben sind, soll in weiterführenden Studien anhand der Untersuchung von XRCC1-defizienten Zellen möglich werden. XRCC1-defiziente Zellen bilden bei einer deutlich niedrigeren MMS-Konzentration (0,1 mM) die gleiche Zahl an γ H2AX-Foci aus wie der korrespondierende Wildtyp nach 1,5 mM MMS (Abb.4.8.B). Durch den Vergleich des SCE-Levels dieser Zelllinien bei diesen Konzentrationen soll in Zukunft überprüft werden, ob eine direkte Korrelation zwischen γ H2AX- und SCE-Induktion besteht.

5.6 MMS-induzierte Replikations-Schäden verhindern die Einleitung der Mitose

Zusammen mit den Untersuchungen zur Induktion von SCEs wurden in dieser Arbeitsgruppe auch die chromosomalen Aberrationen nach MMS analysiert. Dabei konnte in den erhaltenen Metaphase-Präparaten von Wildtyp-Zellen kaum ein Effekt der MMS-Behandlung nachgewiesen werden. Obwohl die Proben zu einem Zeitpunkt nach der MMS-Behandlung analysiert wurden, bei dem die BrdU-markierte Zellpopulation noch einen durchschnittlichen Wert von 30 – 40 γ H2AX-Foci aufwies, wurden in mitotischen Zellen kaum chromosomale Aberrationen detektiert. Auch in PCC-Analysen von MMS-behandelten G2-Zellen wurden in Wildtyp-Zellen kaum Chromosomenbrüche nachgewiesen (persönliche Mitteilung Dr. Sandro Conrad und Christian Ebel).

Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz zwischen den Werten an γ H2AX-Foci und Chromosomenbrüchen wäre, dass die Zellen durch die ein-endigen DSBs nach MMS in der späten S-Phase arretiert werden. Da Zellen in der S-Phase aufgrund einer unvollständigen Kondensation der DNA in PCC-Analysen nicht auswertbar sind (Gotoh + Durante 2006), würden S-Phase-arretierte Zellen in diese Auswertung nicht eingehen. Das geringe Bruch-Level, das im PCC-Ansatz detektiert wurde, wäre somit die Folge davon, dass eine Proliferation MMS-behandelter Zellen in die G2-Phase erst dann möglich wird, wenn die ein-endigen DSBs weitgehend repariert sind. Eine Beurteilung dieser Theorie war anhand der durchgeführten Zellzyklus-Studien jedoch nicht möglich. Die BrdU-markierten Wildtyp-Zellen wurden zu einem Zeitpunkt von 16 h nach einer Behandlung mit 1,5 mM MMS aufgrund ihres DNA-Gehalts zu 80 % einem Zellzyklus-Stadium der späten S- oder G2-Phase zugeordnet (Abb.4.7.B). Eine sichere Unterscheidung zwischen einem späten S-Phase-Stadium und der G2-Phase ist hier aber nicht möglich, da die Unterschiede im DNA-Gehalt dieser beiden Zellpopulationen sehr gering sind. G2-Zellen besitzen einen doppelten DNA-Gehalt und auch in den BrdU-markierten Zellen ist zu einem Zeitpunkt von 16 h nach der MMS-Behandlung die Replikation weitgehend abgeschlossen (Abb.4.7.A). Lediglich an den Orten der ein-endigen DSBs könnten noch unreplizierte DNA-Bereiche vorliegen, so dass auch für diese Zellen ein nahezu doppelter DNA-Gehalt anzunehmen ist.

5.6.1 Analyse MMS-induzierter γ H2AX-Foci in mitotischen Wildtyp-Zellen

Da die Methode der Durchflusszytometrie nicht sensitiv genug ist um sehr geringe Unterschiede des DNA-Gehalts zu detektieren, sollte ein anderer technischer Ansatz zur Unterscheidung von Zellen in der späten S- und G2-Phase gewählt werden. Zwar gibt es in der Immunfluoreszenz spezifische Zellzyklus-Marker für die G2-Phase (z. B. CENP-F), allerdings ist die Expression solcher Proteine nicht ausschließlich auf die G2-Phase begrenzt. So beginnen Zellen schon während der S-Phase CENP-F zu exprimieren, was eine sichere

Unterscheidung von späten S- und G2-Zellen mit solchen Markern nicht erlaubt. Ein klar definiertes und gut abzugrenzendes Stadium des Zellzyklus ist aber die Mitose. Sicher identifizierbar sind mitotische Zellen zum einen anhand einer Phosphorylierung des Histons H3 (bezeichnet als pH3), die mit einem phospho-spezifischen Antikörper detektiert werden kann. Zum anderen kann man anhand des DAPI-Signals eine typische, kondensierte Struktur der Chromosomen in der Mitose erkennen (Abb.4.16.A). Da auch die Chromosomen-Studien in der Mitose kaum Aberrationen MMS-behandelter Wildtyp-Zellen ergaben, sollte zunächst überprüft werden, ob dieser Befund auch auf γ H2AX-Ebene nachgewiesen werden kann.

In der Tat zeigten EdU-markierte mitotische Zellen der Wildtyp-Fibroblastenlinie HSF1 zu einem Zeitpunkt von 16 h nach einer Behandlung mit 1,5 mM MMS fast keine zusätzlichen γ H2AX-Foci im Vergleich zu mitotischen Zellen einer unbehandelten Probe (Abb.4.16.B). Diese Beobachtung korreliert mit dem Ausbleiben chromosomaler Aberrationen in mitotischen Zellen, steht aber im Kontrast zu der hohen Zahl an γ H2AX-Foci (etwa 30 Foci pro Zelle), die zu diesem Zeitpunkt in der Gesamtpopulation EdU-positiver Zellen ermittelt wurde (Abb.4.5, Abb.4.11). Jedoch muss hier berücksichtigt werden, dass bei der untersuchten Bedingung nur sehr wenige mitotische Zellen vorhanden waren, der Großteil der EdU-markierten Zellen befand sich noch in früheren Zellzyklus-Stadien. Dies wird auch anhand der durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen von HSF1 nach 1,5 mM MMS deutlich (Abb.4.7.C). Nicht nur dass sich zu dem untersuchten Zeitpunkt von 16 h nach der MMS-Behandlung erst etwa 5 % der BrdU-markierten Zellpopulation geteilt hatten, auch danach stieg der Anteil BrdU-positiver G1-Zellen kaum an (etwa 20 % nach 24 h). In diesem Zeitraum von 16 – 24 h hat somit immer nur ein geringer Anteil der untersuchten Zellpopulation die Mitose und somit die Zellteilung eingeleitet. In den MMS-behandelten HSF1-Zellen wurden die γ H2AX-Foci auch zu späteren Zeitpunkten (19 h und 22 h) untersucht und auch bei diesen Proben war fast keine Erhöhung der Foci-Zahl im Vergleich zum spontanen Foci-Level in der Mitose nachzuweisen. Zusammen mit den chromosomalen Studien verdeutlicht dies, dass die MMS-behandelten Zellen die Mitose erst dann einleiten, wenn die MMS-induzierten DSBs auf Hintergrund-Niveau repariert wurden.

Diese Beobachtung nach MMS stellt einen deutlichen Unterschied zum Zellzyklusverhalten nach einer Bestrahlung in der G2-Phase dar. In früheren Studien der Arbeitsgruppe wurde der G2/M-Checkpoint als relativ insensitiv für strahleninduzierte DSBs beschrieben. Zwar wird der Checkpoint nach Bestrahlung in der G2-Phase effektiv eingeleitet, jedoch wird der Zellzyklus-Arrest schon bei einem residualen Schadens-Level von 10 – 20 γ H2AX-Foci aufgehoben. Die Zellen gelangen somit mit einer erhöhten Zahl an DSBs in die Mitose, was sich in einer deutlichen Zunahme chromosomaler Aberrationen widerspiegelt (Deckbar et al. 2007, Krempler et al. 2007). Dieses Verhalten konnte in der vorliegenden Arbeit auch auf der Ebene von γ H2AX-Foci bestätigt werden, denn nach einer Bestrahlung in der G2-Phase zeigten die mitotischen Wildtyp-Zellen einen deutlichen Anstieg in der Zahl an γ H2AX-Foci (Abb.4.16.B). Diese unterschiedliche Effizienz des G2/M-Checkpoints für Strahlen- und MMS-

induzierte DSBs legt die Annahme nahe, dass hier unterschiedliche Prozesse ablaufen. So wäre es zum einen denkbar, dass MMS-induzierte DSBs stärkere Checkpoint-Signale auslösen, zum anderen könnte der verminderte Übertritt MMS-behandelter Zellen in die Mitose aber auch durch einen verlängerten Arrest in der S-Phase erklärt werden.

Die Beobachtung, dass zu jedem untersuchten Zeitpunkt nach einer MMS-Behandlung immer nur ein geringer Anteil der BrdU- oder EdU-markierten Zellen in der Mitose vorlag, ist konsistent mit einer starken Schwankung der Anzahl an γ H2AX-Foci in den einzelnen Zellen der EdU-positiven Population. Zu einem Zeitpunkt von 16 h nach 1,5 mM MMS wies ein Teil der untersuchten Zellpopulation ein geringes γ H2AX-Level (< 20 Foci pro Zelle) auf, während in anderen Zellen noch eine sehr hohe Zahl an γ H2AX-Foci (bis etwa 70 Foci pro Zelle) detektiert wurden (siehe auch Abb.4.17.B). Diese starke Schwankung des γ H2AX-Niveaus innerhalb der untersuchten Zellpopulation, die einen durchschnittlichen Wert von 30 Foci pro Zelle ergibt, kann dadurch erklärt werden, dass durch die EdU-Behandlung eine heterogene Population an S-Phase-Zellen markiert wird. Sowohl Zellen in der frühen S-Phase als auch Zellen, die bereits in einem späten Stadium der S-Phase vorliegen, bauen EdU während der 1-stündigen Pulsbehandlung ein. Eine Unterscheidung dieser unterschiedlichen S-Phase-Stadien ist anhand des flächigen EdU-Signals in der Immunfluoreszenz aber nicht möglich. Da die Ausbildung MMS-induzierter γ H2AX-Foci direkt mit der Replikation korreliert, ist das Ausmaß der Replikationsvorgänge einer Zelle für das erzeugte Schadens-Level entscheidend. So sollten Zellen, die sich zum Zeitpunkt der MMS-Behandlung bereits in der späten S-Phase befinden, relativ wenige ein-endige DSBs ausbilden. Es ist daher davon auszugehen, dass gerade diese Subpopulation der EdU-markierten Zellen, die relativ wenige MMS-induzierte γ H2AX-Foci ausbildet, die Reparaturvorgänge dieser Schäden schnell abgeschlossen hat. Diese Zellen sollten somit die Subpopulation darstellen, die die Mitose als erstes einleitet. Im Gegensatz dazu finden in Zellen, die zu einem frühen Zeitpunkt in der S-Phase mit MMS behandelt werden, sehr viele Replikationsereignisse statt, so dass für diese Zellen eine besonders starke Ausbildung ein-endiger DSBs und somit eine besonders hohe Zahl persistierender Foci nach langen Reparaturzeiten angenommen werden kann.

5.6.2 Analyse MMS-induzierter γ H2AX-Foci in praemitotischen Zellzyklus-Stadien einer Wildtyp-Zelllinie

Aufgrund der hohen Schwankung im individuellen γ H2AX-Niveau bei späten Reparaturzeiten nach MMS wurde ein Ansatz etabliert, mit dem unterschiedliche Subpopulationen der EdU-markierten Zellen anhand eines unterschiedlichen pH3-Signals klassifiziert wurden. Zwar gilt pH3 als eine Marker für mitotische Zellen (Prigent + Dimitrov 2003) und in diesen Zellen wurde auch die stärkste pH3-Intensität beobachtet, dennoch zeigten auch Zellen in praemitotischen Zellzyklus-Stadien bereits ein detektierbares pH3-Signal. Anhand der Stärke und

der Morphologie des Signals wurden die EdU-positiven Zellen in vier Kategorien eingeteilt (Abb.4.17.A). Zwar ist es nicht möglich diesen Kategorien ein spezifisches Zellzyklus-Stadium zuzuordnen, dennoch scheint es plausibel, das Fortschreiten der Zellen im Zellzyklus mit dem pH3-Signal zu korrelieren. Zellen, die bereits eine sehr starke pH3-Intensität aufweisen aber aufgrund einer noch nicht erkennbaren Kondensation der DNA nicht der Mitose zugeordnet werden, sollten sich demnach in einem Stadium kurz vor dem Übertritt in die Metaphase befinden. Dagegen sollten Zellen, in denen die H3-Proteine noch kaum phosphoryliert vorliegen, einem Zellzyklus-Stadium zugeordnet werden, welches noch weiter von der Mitose entfernt ist (z. B. der späten S-Phase). Die Analyse der MMS-induzierten γ H2AX-Foci in diesen vier Kategorien ergab eine deutliche Korrelation des Foci-Levels mit der gewählten pH3-Klassifizierung, denn mit steigendem pH3-Signal sank die Zahl an γ H2AX-Foci kontinuierlich ab (Abb.4.17.B). Dies verdeutlicht einen Zusammenhang zwischen dem Schadens-Level einer Zelle und ihrem Fortschritt im Zellzyklus und unterstützt die Annahme, dass Zellen erst dann in ein Stadium direkt vor der Mitose übergehen, wenn der Großteil an MMS-induzierten DSBs repariert wurde.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch ein Vergleich mit der Entwicklung an γ H2AX-Foci in unbehandelten Zellen, denn auch hier konnte eine Abnahme an γ H2AX-Foci mit steigendem pH3-Signal beobachtet werden. Die Zellen, die zu einem Zeitpunkt von 5 h nach der EdU-Markierung den ersten beiden pH3-Kategorien zugeordnet wurden, zeigten unbehandelt einen durchschnittlichen Wert von etwa 20 γ H2AX-Foci pro Zelle (Abb.4.17.B). Dies entspricht dem Wert, der auch in anderen Experimenten als spontanes γ H2AX-Level unbehandelter HSF1-Zellen in der S-Phase beobachtet wurde (Abb.4.5.B). Dadurch wird die Annahme unterstützt, dass Zellen mit einem schwachen pH3-Signal auch nach späteren Zeiten der S-Phase zuzuordnen sind. Die Abnahme der Zahl an γ H2AX-Foci in den Zellen mit stärkerem pH3-Signal (Kategorie 3 + 4) ist dagegen konsistent mit der Annahme, dass sich diese Zellen bereits in späteren Zellzyklus-Stadien befinden, in denen die Ausbildung spontaner, Replikations-assoziiierter DSBs abgeschlossen ist und die Prozesse zur Reparatur dieser Schäden überwiegen. Bei dem Vergleich der γ H2AX-Level MMS-behandelter und unbehandelter Zellen wird deutlich, dass diese in der Subpopulation an Zellen, die sich kurz vor dem Eintritt in die Mitose befinden (pH3-Kategorie 4), bei beiden Bedingungen fast identisch sind (Abb.4.17.B). Somit scheinen die Zellen nach einer MMS-Behandlung dieses späte Zellzyklus-Stadium erst dann zu erreichen, wenn die Zahl an MMS-induzierten γ H2AX-Foci fast auf das spontane Hintergrund-Niveau gesunken ist. Diese Beobachtung ist konsistent mit der vergleichbaren Zahl an γ H2AX-Foci und chromosomalen Aberrationen MMS-behandelter und unbehandelter Zellen in der Mitose.

Bei der Analyse von γ H2AX-Foci in mitotischen Zellen wurden auch Ansätze untersucht, bei denen die Zellen für 3 h vor der Fixierung mit 2 mM Koffein behandelt wurden. Koffein ist ein Hemmstoff der Kinasen ATM, ATR und DNA-PK und durch eine Koffeinbehandlung kann ein

durch diese Kinasen eingeleiteter Zellzyklus-Arrest aufgehoben werden. Interessanterweise wurde trotz einer Aufhebung des G2/M-Arrests durch die Koffein-Behandlung kaum ein Anstieg der MMS-induzierten γ H2AX-Zahl in mitotischen Zellen detektiert (Abb.4.16.B). Zusammen mit der Beobachtung, dass der Anteil an EdU-positiven mitotischen Zellen trotz der künstlich eingeleiteten Aufhebung des G2/M-Checkpoints durch Koffein-Zugabe nur leicht erhöht wurde (Daten nicht dargestellt), unterstützt dies die Annahme, dass sich die Mehrheit der Zellen in einem früheren Zellzyklus-Stadium als der G2-Phase befand. Nur die Zellen, die bereits ein Stadium kurz vor der Mitose erreicht hatten, konnte nach der Aufhebung des G2/M-Checkpoints die Mitose einleiten. Dies wird auch daran deutlich, dass das γ H2AX-Level in mitotischen Zellen nach der Koffein-Zugabe (Abb.4.16.B) etwa auf das Niveau anstieg (ca. 9 Foci), das in den Zellen direkt vor der Mitose detektiert wurde (Abb.4.17.B).

Diese Beobachtungen sind ein weiteres Zeichen dafür, dass die MMS-behandelten Zellen tatsächlich noch in einem späten Stadium der S-Phase vorliegen, so dass die Aufhebung des G2/M-Checkpoints durch Koffein-Zugabe keinen Effekt auf diese Zellen hatte. Zudem spricht das Verhalten nach Koffein-Zugabe dafür, dass der lange Verbleib der Zellen in der S-Phase nicht auf einen aktiv über Kinasen eingeleiteten Zellzyklus-Arrest zurückzuführen ist. Stattdessen könnte es sich hier um eine Art physikalischer Blockade des Zellzyklus handeln. Diese könnte auf noch vorhandene Replikations-assoziierte Strukturen infolge der DNA-Schädigung oder in Form von Intermediaten der ablaufenden Reparaturvorgänge zurückzuführen sein, die einen Übertritt in die G2-Phase verhindern. Die Annahme, dass der Arrest MMS-behandelter Zellen nicht auf aktiven Checkpoint-Signalen beruht, scheint auch durch die durchflusszytometrischen Untersuchungen ATM- und ATR-defizienter Fibroblasten in dieser Arbeit unterstützt zu werden. Für beide Zelllinien wurde nach MMS ein vergleichbares Zellzyklusverhalten wie in Wildtyp-Zellen beobachtet, ein Defekt in der Einleitung oder der Aufrechterhaltung des G2/M-Checkpoints wurde nicht detektiert (Abb.4.19). Dies könnte für eine ATM- und ATR-unabhängigen Zellzyklus-Arrest in der späten S-Phase nach MMS sprechen.

Diese Annahme steht allerdings nicht im Einklang mit verschiedenen Studien, die eine Aktivierung ATM- und ATR-abhängiger Signalwege nach einer Behandlung mit MMS beschrieben haben. So wurden mit biochemischen Methoden Phosphorylierungen von ATM- und ATR-Substraten (z. B. Chk1) nach einer MMS-Behandlung nachgewiesen, die typische Signale der Zellzykluskontrolle darstellen (Brem et al. 2008). Wie in Kapitel 5.3.2 diskutiert wurde, sollten nach einer MMS-Behandlung Strukturen erzeugt werden, die sowohl ein Signal für ATM (ein-endige DSBs) als auch für ATR (einzelsträngige Bereiche an arretierten Replikationsgabeln und an ein-endigen DSBs) darstellen. Es erscheint somit nicht plausibel anzunehmen, dass es nach MMS nicht zu einer Aktivierung der beiden Kinasen und nachfolgender Signalkaskaden kommt. Auch in einer neueren Studie sind distinkte Reaktionen von ATM und ATR innerhalb der Signalwege des Intra-S-Checkpoints beschrieben worden (Horton et al. 2011).

Dennoch schließt eine Aktivierung von ATM und ATR das zuvor postulierte Modell einer physikalischen Blockade des Zellzyklus in der späten S-Phase nicht aus. Es wäre denkbar, dass so zwei parallele Wege existieren, die zu einem MMS-induzierten Zellzyklus-Arrest beitragen. Während die physikalische Blockade die Zellen in der späten S-Phase arretiert, könnten die ATM- und ATR-abhängigen Wege für einen effizienten G2/M-Checkpoint wichtig sein, der den Übertritt der Zellen in die Mitose verhindert, nachdem diese in die G2-Phase progressiert sind. Solch ein in der S-Phase initiiertes G2/M-Checkpoint wurde bereits in früheren Publikationen beschrieben (Bartek et al. 2004). Alternativ könnte die beobachtete vollständige Einleitung und Aufrechterhaltung eines MMS-induzierten Zellzyklus-Arrests in ATM- und ATR-defizienten Zellen (Abb.4.19) aber auch auf eine Redundanz der beiden Kinasen zurückzuführen sein.

Zusammengefasst geben die Analysen MMS-induzierter γ H2AX-Foci in mitotischen und in praemitotischen Stadien von HSF1-Zellen deutliche Hinweise darauf, dass die Zellen mit MMS-induzierten ein-endigen DSBs in einem späten Stadium der S-Phase arretieren, auch wenn die zellulären Prozesse, auf denen dieses Verhalten beruht, noch unklar sind. Erst wenn diese Schäden fast auf Hintergrund-Niveau repariert sind, können die Zellen in die G2-Phase progressieren und erhalten die potentielle Fähigkeit die Mitose einzuleiten. Eine Beurteilung des genauen Beitrags von ATM und ATR an diesen Prozessen ist auf Basis der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit schwierig, da sowohl eine Redundanz der beiden Kinasen als auch ein von diesen Faktoren unabhängiger Prozess möglich erscheint. Für eine genauere Klärung der ablaufenden Prozesse sind hier weitere Untersuchungen erforderlich.

5.6.3 Analyse MMS-induzierter γ H2AX-Foci in mitotischen Zellen und praemitotischen Zellzyklus-Stadien einer HR-defizienten Zelllinie

Die zuvor beschriebenen Zellzyklus-spezifischen γ H2AX-Analysen wurden nicht nur in Wildtyp-Zellen sondern auch in der BRCA2-defizienten Fibroblasten-Linie HSC62 durchgeführt. Ziel war es dabei die Auswirkungen des starken Reparaturdefektes dieser Zelllinie (Abb.4.11.A) auf das γ H2AX-Niveau in den unterschiedlichen Zellzyklus-Stadien zu untersuchen. Die hohe Zahl verbliebener γ H2AX-Foci, die in den Reparaturkinetiken von HSC62 zu einem Zeitpunkt von 16 h nach der Behandlung mit 1,5 mM MMS auftrat (Abb.4.11.A), wurde auch im pH3-spezifischen γ H2AX-Ansatz der praemitotischen Zellzyklus-Stadien deutlich. Für jede der vier definierten pH3-Kategorien wurde in HSC62 ein höherer γ H2AX-Wert ermittelt als in Wildtyp-Zellen (HSF1). Der Reparaturdefekt von HSC62 manifestierte sich dabei vor allem in einer Zunahme der Differenz an γ H2AX-Foci zwischen HSF1 und HSC62 mit steigender pH3-Intensität (Abb.4.17.B). Zwar war dabei auch in HSC62 eine Abnahme des γ H2AX-Levels mit steigendem pH3-Signal zu beobachten, diese kann aber auf den hypomorphen Charakter der BRCA2-Mutation zurückgeführt werden. Dennoch wird dadurch

verdeutlicht, dass HSC62 trotz der stark eingeschränkten Reparaturkapazität in der Lage sind, dieses späte Stadium vor der Mitose zu erreichen. Die für Wildtyp-Zellen getroffene Annahme, dass dies erst dann möglich ist, wenn die MMS-induzierten DSBs weitgehend repariert sind, kann auf HSC62 somit nicht übertragen werden.

Obwohl die BRCA2-defizienten HSC62-Zellen also mit einem erhöhten γ H2AX-Level einen Zustand direkt vor der Mitose erreichen können, hatte dies nur einen geringen Einfluss auf die γ H2AX-Zahl in mitotischen Zellen, denn nach einer MMS-Behandlung wurde nur eine leichte Zunahme mitotischer γ H2AX-Foci in HSC62 detektiert (Abb.4.16.B). Dies stellt einen Hinweis auf einen effektiven G2/M-Arrest nach MMS in diesen Zellen dar, durch den die Einleitung der Mitose auch dann verhindert wird, wenn die Zellen vermehrt MMS-induzierte γ H2AX-Foci in der G2-Phase aufweisen. Der G2/M-Checkpoint scheint dabei für MMS-induzierte DSBs effektiver zu sein als für strahleninduzierte DSBs, denn HSC62-Zellen, die in der G2-Phase bestrahlt wurden, zeigten ein deutlich höheres γ H2AX-Level in mitotischen Zellen als nach einer MMS-Behandlung (Abb.4.16.B). Dieser effektive Zellzyklus-Arrest nach MMS wird auch anhand des durchflusszytometrisch ermittelten Zellzyklusverhaltens von HSC62 deutlich. Hier verhielten sich diese Zellen ähnlich wie MMS-behandelte Wildtyp-Zellen. In einer aktuellen Publikation wurde eine Beteiligung von BRCA2 bei der Aufrechterhaltung des G2/M-Checkpoints beschrieben (Menzel et al. 2011). Eine frühere Aufhebung eines G2/M-Arrests in BRCA2-defizienten Zellen, wie es in dieser Studie beobachtet wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht detektiert werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Menzel et al. lediglich des Zellzyklusverhalten BRCA2-defizienter Zellen nach ionisierender Strahlung untersucht haben. Die dabei gewonnenen Ergebnisse scheinen auf die Situation nach einer MMS-Behandlung nicht direkt übertragbar zu sein. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass in ATM-defizienten Zellen, für die ein Defekt in der Einleitung des G2/M-Checkpoints nach einer Bestrahlung in der G2-Phase beschrieben wurde (Deckbar et al. 2007), ebenfalls kein Unterschied im Zellzyklusverhalten nach MMS im Vergleich zu Wildtyp-Zellen beobachtet wurde (Abb.4.19).

Die Beobachtung, dass die BRCA2-defizienten HSC62-Zellen ein erhöhtes γ H2AX-Level in dem Zellzyklus-Stadium direkt vor der Mitose aufweisen (Abb.4.17.B), wird auch bei der Analyse mitotischer Zellen nach einer Behandlung mit Koffein deutlich. Im Gegensatz zu den untersuchten Wildtyp-Zellen resultierte eine Koffein-Zugabe in HSC62 in einem deutlichen Anstieg der Zahl MMS-induzierter γ H2AX-Foci in der Mitose (Abb.4.16.B). Der ermittelte Wert lag zwar nicht so hoch wie die Foci-Zahl, die in den Zellen direkt vor der Mitose detektiert wurde, dennoch verdeutlicht dieses Ergebnis, dass die BRCA2-defizienten Zellen durch die Koffein-vermittelte Aufhebung des G2/M-Checkpoints mit einem erhöhten Niveau an unreparierten DSBs in die Mitose übergangen.

Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen, kann folgendes Modell postuliert werden: Durch die Behandlung mit MMS werden die Zellen in der S-Phase verzögert. Wildtyp-Zellen

scheinen dabei über einen langen Zeitraum in der späten S-Phase zu persistieren, bis die MMS-induzierten DSBs weitgehend repariert sind. Erst dann erreichen die Zellen das Stadium einer G2-Zelle und können die Mitose einleiten. Sowohl in diesem G2-Stadium als auch in der Mitose können daher kaum noch MMS-induzierte γ H2AX-Foci nachgewiesen werden. BRCA2-defiziente Zellen persistieren dagegen anscheinend nicht permanent in der späten S-Phase sondern progressieren mit einem erhöhten Schadens-Level in die G2-Phase. Dort wird der Eintritt in die Mitose zwar durch einen effektiven G2/M-Checkpoint verhindert, eine Aufhebung der Checkpoint-Signale durch Zugabe von Koffein resultiert aber in einem erhöhten Schadens-Niveau in der Mitose. Dieses Modell ist konsistent mit den chromosomalen Studien, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. In Wildtyp-Zellen konnte sowohl während der G2-Phase als auch während der Mitose kaum eine erhöhte Rate chromosomaler Aberrationen nach MMS detektiert werden. Dagegen zeigten BRCA2- oder Rad51-depletierte Zellen sowohl in der G2-Phase als auch in der Mitose (nach Zugabe von Koffein) eine sehr große Zahl an Chromosomenbrüchen (persönliche Mitteilung Dr. Sandro Conrad, Christian Ebel).

Auch wenn die in der vorliegenden Arbeit und in den chromosomalen Studien erhaltenen Ergebnisse deutliche Hinweise für das zuvor beschriebene Modell darstellen, besteht dennoch die Frage, warum BRCA2-defiziente Zellen nach der MMS-Behandlung in die G2-Phase progressieren. Eine Beantwortung dieser Frage ist im Moment noch schwierig und wird Gegenstand weiterer Studien sein. Einen Ansatzpunkt liefert dabei eine aktuelle Publikation, in der eine neue Funktion von BRCA2 beschrieben wurde (Schlacher et al. 2011). In dieser Studie wurde gezeigt, dass BRCA2 neben der direkten Rolle als Reparaturfaktor im HR-Vorgang auch eine protektive Funktion an arretierten Replikationsgabeln besitzt. Verantwortlich dafür ist eine konservierte Rad51-Bindedomäne im C-Terminus, mit der sich BRCA2 an das Rad51-Nukleoproteinfilament anlagert (Esashi et al. 2005). Zellen mit einer BRCA2-Variante ohne diese C-terminale Domäne sind zwar HR-profizient, an arretierten Replikationsgabeln (nach einer Behandlung mit HU) erfolgt aber eine verstärkte Degradation bereits replizierter DNA-Bereiche, die in einer Zunahme chromosomaler Aberrationen resultiert. Diese übermäßige Degradation scheint im Wildtyp durch die Anlagerung von BRCA2 an das Rad51-Nukleoproteinfilament verhindert zu werden (Schlacher et al. 2011). Vielleicht ist solch eine BRCA2-vermittelte Stabilisierung der an einen ein-endigen DSB angelagerten Rad51-Proteine wichtig für den Verbleib MMS-behandelter Zellen in der späten S-Phase. So könnte man spekulieren, dass ein MMS-induzierter, ein-endiger Bruch durch Faktoren des Replisoms in räumlicher Nähe zu dem intakten DNA-Doppelstrang gehalten wird und dass dafür eine Stabilisierung dieser Struktur durch BRCA2 wichtig ist. Im Gegensatz dazu würde diese Struktur in BRCA2-defizienten Zellen nicht stabil verbleiben und der ein-endige Bruch könnte sich vom intakten Doppelstrang entfernen. Vielleicht wird dadurch genau die Struktur aufgelöst, die für den Arrest von Wildtyp-Zellen in der späten S-Phase verantwortlich ist. Für eine Überprüfung dieser Theorie und eine sichere Klärung der Vorgänge in BRCA2-defizien-

ten Zellen sind aber weitere Untersuchungen nötig. So sollen in Zukunft u. a. auch Zellen mit der zuvor beschriebenen C-terminal mutierten BRCA2-Variante untersucht werden.

5.7 Die HR-Prozesse in der S- und der G2-Phase unterscheiden sich in den beteiligten Reparaturfaktoren

Der letzte Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit dem Vergleich der HR-Prozesse an MMS-induzierten ein-endigen DSBs in der S-Phase und strahleninduzierten, zwei-endigen DSBs in der G2-Phase. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass die HR nach Bestrahlung in der G2-Phase lediglich für die Reparatur der Subpopulation an DSBs benötigt wird, die in heterochromatischen Bereichen induziert werden. In dieser Studie wurden mit der Kinase ATM und der Nuklease Artemis zudem zwei Faktoren identifiziert, die an diesem heterochromatischen HR-Weg beteiligt sind (Beucher et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit sollte nun überprüft werden, ob eine Beteiligung dieser Faktoren auch bei den HR-Prozessen nach MMS auftritt. Dadurch sollte beurteilt werden, ob ATM und Artemis als generelle HR-Faktoren anzusehen sind oder ob sie lediglich eine spezifische Funktion im Heterochromatin übernehmen. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Kinase ATR, die in der S-Phase essentielle regulatorische Funktionen besitzt (Shechter et al. 2004b), auch an den Reparaturprozessen MMS-induzierter DSBs beteiligt ist.

5.7.1 ATM und Artemis sind nicht an der Reparatur MMS-induzierter DSBs beteiligt

Anhand von γ H2AX-Reparaturstudien nach Behandlung mit MMS und nach Bestrahlung in der G2-Phase kann eine generelle Funktion von ATM und Artemis während der HR ausgeschlossen werden. Nach einer Bestrahlung mit 2 Gy in der G2-Phase wurde in ATM- und Artemis-defizienten Fibroblasten ein γ H2AX-Reparaturdefekt in der langsamen Reparaturkomponente detektiert, der vergleichbar stark ausgeprägt war wie in BRCA2-defizienten Zellen (Abb.4.18.C). Dieses Reparaturverhalten ist vergleichbar mit den bereits veröffentlichten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe (Beucher et al. 2009). Im Gegensatz dazu konnte aber sowohl für ATM- als auch für Artemis-defiziente Zellen keine Beeinträchtigung in der Reparatur MMS-induzierter DSBs beobachtet werden (Abb.4.18.A). Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurden kaum Unterschiede zum Reparaturverhalten in Wildtyp-Zellen detektiert. Die unterschiedliche Bedeutung von ATM und Artemis wird dabei auch auf Ebene von Rad51-Foci deutlich. Während G2-bestrahlte Zellen ohne ATM oder Artemis einen deutlichen Defekt in der Ausbildung von Rad51-Foci aufwiesen (Abb.4.18.D), zeigten die Rad51-Kinetiken in ATM- und Artemis-defizienten Zellen nach MMS den gleichen Verlauf wie im Wildtypen (Abb.4.18.B). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der heterochroma-

tische HR-Weg in der G2-Phase ohne ATM und Artemis bereits initial unterbunden wird, wobei eine Defizienz von ATM einen stärkeren Effekt hat (Abb.4.18.D). An der Reparatur MMS-induzierter, ein-endiger DSBs sind ATM und Artemis dagegen nicht beteiligt. Diese Beobachtung konnte auch durch SCE-Analysen innerhalb unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden. So ist das SCE-Level in ATM- oder Artemis-depletierten Zellen nach einer Bestrahlung in der G2-Phase auf Hintergrund-Niveau reduziert (Beucher et al. 2009). Nach einer MMS-Behandlung zeigen diese Zellen aber wie Wildtyp-Zellen eine unverändert hohe SCE-Rate (persönliche Mitteilung Dr. Sandro Conrad).

Für ATM konnten zwei getrennte Funktionen bei der heterochromatischen HR nachgewiesen werden. Für eine Reparatur von DSBs im Heterochromatin ist eine lokale Öffnung dieser hochkondensierten Chromatin-Struktur notwendig. Eine essentielle Reaktion ist dabei eine Phosphorylierung des Heterochromatin-Bildungsfaktors KAP-1 durch ATM (Goodarzi et al. 2008, Goodarzi et al. 2010). In ATM-defizienten Zellen kann diese Phosphorylierung nicht erfolgen und das Heterochromatin kann nicht geöffnet werden, was eine Reparatur der DSBs verhindert. Dies wird unter anderem dadurch verdeutlicht, dass eine künstlich eingeleitete Dekondensierung heterochromatischer Bereiche durch eine Depletion von KAP-1 den Reparaturdefekt in AT-Zellen aufheben kann (Beucher et al. 2009). Eine zweite Funktion von ATM im heterochromatischen HR-Weg besteht in der Phosphorylierung von CtIP (Li et al. 2000). Diese Nuklease ist wichtig für den initialen Schritt der End-Resektion an einem DSB und ohne diese Aktivität von CtIP kann die HR nicht eingeleitet werden (Sartori et al. 2007, Huertas et al. 2008). Daher zeigen CtIP-depletierte Zellen auch einen deutlichen Defekt in der Ausbildung von Rad51-Foci (Beucher et al. 2009).

Im Gegensatz zu ATM ist die Funktion von Artemis in der heterochromatischen HR noch nicht abschließend aufgeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass die Endonuklease-Aktivität von Artemis entscheidend für den Ablauf der HR ist. Zusammen mit dem in Artemis-Zellen beobachteten Defekt in der Ausbildung von Rad51-Foci (Abb.4.18.D) spricht dies für eine Funktion von Artemis bei der Resektion der Bruchenden. Welche genaue Rolle Artemis bei der End-Resektion spielt, ist nicht klar, es wurde aber die Theorie aufgestellt, dass es bei der Resektion heterochromatischer Bereiche aufgrund der hohen Dichte an repetitiven Sequenzen häufig zur Ausbildung von Sekundärstrukturen wie DNA-Schleifen oder Haarnadelstrukturen kommt. Artemis könnte die Funktion haben diese Strukturen endonukleolytisch zu spalten um so weitere Reparaturvorgänge zu ermöglichen (Beucher et al. 2009).

Diese Funktionen von ATM und Artemis bei der Reparatur heterochromatischer DSBs in der G2-Phase kann auf die Replikations-assoziierten DSBs nach MMS nicht übertragen werden, was zum Teil auf den Status des Heterochromatins in der S-Phase zurückzuführen ist. Während der Replikation kommt es zu dynamischen Änderungen der Chromatin-Struktur durch posttranslationale Histon-Modifikationen (Rampakakis et al. 2009). Es ist daher plausibel, dass auch die heterochromatischen Bereiche der DNA zum Zeitpunkt der Replikation in einem entspannten Zustand vorliegen. Für die Reparatur eines DSBs, der an einer Replika-

tionsgabel aufgetreten ist, muss das Chromatin also auch in heterochromatischen Bereichen nicht mehr entspannt werden. Eine ATM-abhängige Phosphorylierung von KAP-1 ist für die Reparaturprozesse an ein-endigen DSBs somit nicht nötig.

Die in dieser Arbeit erstellten γ H2AX-Reparaturkinetiken in Artemis-defizienten Zellen verdeutlichen, dass auch Artemis keine Funktion bei der Reparatur MMS-induzierter DSBs besitzt (Abb.4.18.A). Folgt man der Theorie, dass Artemis in der G2-Phase wichtig ist um bei der Resektion entstandene Sekundärstrukturen der einzelsträngigen DNA-Bereiche aufzulösen (Beucher et al. 2009), kann man postulieren, dass solche Strukturen an Replikations-assoziierten DSBs nicht auftreten. Dies könnte auf die zahlreichen Proteine an einer Replikationsgabel zurückzuführen sein. Faktoren des Replisoms (z. B. RPA) lagern sich an die einzelsträngigen DNA-Bereiche der Replikationsgabel an und es wäre denkbar, dass diese Proteine auch nach der Ausbildung eines ein-endigen DSBs an den einzelsträngigen Bereichen verbleiben. Dies könnte der Ausbildung von Sekundärstrukturen entgegenwirken, so dass die beschriebene Endonuklease-Aktivität von Artemis an ein-endigen DSBs nicht benötigt wird. Alternativ könnten in der S-Phase aber auch andere Nukleasen aktiv sein als in der G2-Phase und eine Artemis-Defizienz kompensieren.

Neben der Öffnung des Heterochromatins durch eine Phosphorylierung von KAP-1 besitzt ATM mit der Aktivierung von CtIP noch eine weitere, essentielle Funktion für den HR-Prozess in der G2-Phase. CtIP wird aber nicht nur durch ATM reguliert, auch CDK-abhängige Phosphorylierungen von CtIP wurden beschrieben (Huertas + Jackson 2009, Yun + Hiom 2009). Es wäre somit denkbar, dass die Aktivität von CtIP in der S-Phase nicht über ATM sondern über CDKs reguliert wird, so dass eine ATM-Defizienz keinen Einfluss auf die CtIP-Funktion an MMS-induzierten DSBs hat. Zur Überprüfung dieser Theorie sind aber weitere Untersuchungen nötig.

Die Beobachtung einer uneingeschränkten Reparaturkapazität von AT-Zellen nach MMS auf γ H2AX-Ebene (Abb.4.18.A) steht im Widerspruch zu einer Publikation, in der eine leichte Empfindlichkeit ATM-defizienter Mauszellen gegenüber MMS beschrieben wurde (Debiak et al. 2004). In dieser Studie konnte aber gezeigt werden, dass diese Empfindlichkeit spezifisch auf die toxische Wirkung von O6-Methylguanin zurückgeführt werden kann, auch wenn dieser Basenschaden durch MMS nur zu einem sehr geringen Anteil induziert wird (Beranek 1990). In einer neueren Studie konnte zudem die Wirkungsweise dieser Läsion genauer aufgeklärt werden. Eine Besonderheit besteht dabei darin, dass sich die toxische Wirkung von O6-Methylguanin erst in der zweiten S-Phase nach der Schadensinduktion manifestiert (Roos et al. 2009). Da in den Studien der vorliegenden Arbeit aber nur ein Zeitraum untersucht wurde, der die Zellzyklus-Stadien von der ersten S-Phase bis zur Mitose umfasste, konnte diese O6-Methylguanin-spezifische DNA-Schädigung nicht detektiert werden. Der Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit und der zuvor beschriebenen Publikationen (Debiak et al. 2004) verdeutlicht, dass die Ergebnisse von γ H2AX-Reparaturstudien und Überlebensexperimenten nicht immer direkt aufeinander übertragbar sind.

5.7.2 MDC1 und 53BP1 besitzen unterschiedliche Funktionen bei den HR-Prozessen in der S- und der G2-Phase

Die uneingeschränkte Reparaturkapazität von AT-Zellen nach MMS wurde unter anderem damit erklärt, dass eine ATM-abhängige Öffnung des Heterochromatins, welche durch eine Phosphorylierung von KAP-1 vermittelt wird, für eine Reparatur MMS-induzierter DSBs nicht notwendig ist. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde die Bedeutung der Mediatorproteine MDC1 und 53BP1 nach einer MMS-Behandlung untersucht. In früheren Studien wurde gezeigt, dass MDC1 und 53BP1 wichtige Funktionen bei der lokalen Entspannung heterochromatischer Bereiche besitzen und somit wichtig für eine Reparatur von DSBs in diesen Regionen sind. Daher zeigen MDC1- oder 53BP1-defiziente Zellen ähnliche Phänotypen wie AT-Zellen. So bilden sie nach Bestrahlung in der G1-Phase einen vergleichbaren γ H2AX-Reparaturdefekt wie bei einer ATM-Defizienz aus. Durch eine Depletion von KAP-1 und eine damit künstlich eingeleitete Öffnung des Heterochromatins kann der Reparaturdefekt dieser drei Faktoren aufgehoben werden (Noon et al. 2010). Die genauen Funktionen von MDC1 und 53BP1 innerhalb der Signalwege zur Öffnung des Heterochromatins sind Gegenstand aktueller Forschung und noch nicht vollständig aufgeklärt. Es konnte aber gezeigt werden, dass das Level an phosphoryliertem KAP-1 in der Umgebung eines heterochromatischen DSBs ohne MDC1 oder 53BP1 reduziert ist (Noon et al. 2010).

MDC1 spielt eine wichtige Rolle bei Verstärkungsreaktionen der initialen Phosphorylierungen von ATM an einem Bruchende, die u. a. in der Ausbreitung des γ H2AX-Signals über einen Bereich von mehreren Megabasenpaaren um den DSB herum resultieren (Jungmichel + Stucki 2010). Vermittelt über eine Phosphorylierung von MDC1 durch ATM (Stucki + Jackson 2004) wird zudem ein Signalweg eingeleitet, an dem die beiden Ubiquitin-Ligasen RNF8 und RNF168 beteiligt sind und an dessen Ende unter anderem die Rekrutierung von 53BP1 an das Bruchende steht (Huen et al. 2007, Stewart et al. 2009, Lukas et al. 2011). Bei einer Defizienz von MDC1 werden diese Signalwege nicht eingeleitet, wodurch u. a. 53BP1 nicht an den Bruch rekrutiert wird und auch die Zahl an aktiven ATM-Molekülen gering bleibt. Das führt zu einem geringen Level an phosphoryliertem KAP-1 und einer ineffizienten Öffnung des Heterochromatins. Die genaue Funktion von 53BP1 an diesem Prozess ist noch nicht klar, es wurde aber postuliert, dass 53BP1 dazu dienen könnte die lokale Konzentration an MRN-Komplexen an einem DSB zu erhöhen und dadurch die Aktivierung von ATM zu verstärken (Noon et al. 2010).

Diese wichtige Funktion der beiden Mediatorproteine bei der Reparatur heterochromatischer DSBs in der G1-Phase wurde in der vorliegenden Arbeit auch nach einer Bestrahlung in der G2-Phase beobachtet. Hier trat in MDC1- oder 53BP1-depletierten Zellen ein γ H2AX-Reparaturdefekt in der langsamen Reparaturkomponente auf. Dieser Defekt verhielt sich epistatisch zu ATM, da eine zusätzliche Inhibition von ATM mit einem spezifischen Hemmstoff keinen additiven Effekt zeigte (Abb.4.20.B). Alle drei Faktoren können somit dem

gleichen Reparaturprozess in der G2-Phase zugeordnet werden, nämlich der HR-abhängigen Reparatur Heterochromatin-assoziiierter DSBs.

Im Gegensatz zur Situation in der G2-Phase wurde für die beiden Mediatorproteine eine unterschiedliche Bedeutung bei der Reparatur MMS-induzierter DSBs beobachtet. So zeigten 53BP1-depletierte Zellen keine Beeinträchtigung in ihrer Reparaturkapazität nach MMS (Abb.4.20.A). Dieses Verhalten ist vergleichbar mit dem in AT-Zellen (Abb.4.18.A) und ist konsistent mit der Annahme, dass eine Öffnung des Heterochromatins zur Reparatur einseitiger DSBs nach MMS nicht nötig ist. Im Gegensatz dazu bildeten MDC1-depletierte Zellen aber einen deutlichen Reparaturdefekt nach MMS aus (Abb.4.20.A). Dies verdeutlicht, dass MDC1 neben der lokalen Entspannung des Heterochromatins in der G1- und G2-Phase noch eine weitere Funktion während der Reparatur MMS-induzierter DSBs besitzt. Zusammen mit den γ H2AX-Reparaturstudien dieser Arbeit, die eine Determinierung dieser einseitigen DSBs für den HR-Weg verdeutlichen (Abb.4.11, Abb.4.13, Abb.4.14), spricht dies für eine Funktion von MDC1 im HR-Prozess. Eine Rolle von MDC1 im HR-Prozess wurde bereits in früheren Studien postuliert. So wurde in MDC1-depletierten Zellen eine geringere HR-Rate ermittelt. Gleichzeitig wurde eine deutliche Erhöhung der HR-Frequenz nach einer 53BP1-Depletion detektiert, was für eine HR-hemmende Wirkung von 53BP1 spricht (Xie et al. 2007). Diese Annahme steht im Einklang mit einem Modell, nachdem sich 53BP1 effektiv an Bruchenden anlagert und gezielt vom Bruchende entfernt werden muss, wenn ein DSB dem HR-Weg zugeführt werden soll (Bunting et al. 2010).

Eine generelle Bedeutung von MDC1 an der HR, die über die Öffnung des Heterochromatins hinausgeht, wird nicht nur anhand des Reparaturdefekts MDC1-depletierter Zellen nach MMS deutlich (Abb.4.20.A) sondern konnte auch in G2-Zellen bestätigt werden. So kann zwar ein 53BP1-abhängiger Reparaturdefekt nach Bestrahlung in der G2-Phase durch eine Depletion von KAP-1 aufgehoben werden, der Reparaturdefekt in MDC1-depletierten Zellen bleibt aber bestehen. Dies kann dabei auf γ H2AX-, Rad51- und SCE-Ebene bestätigt werden (persönliche Mitteilung Prof. Penny Jeggo, University of Sussex). Die genaue Funktion von MDC1 im HR-Prozess ist noch unbekannt, es wurde aber eine direkte Interaktion von MDC1 mit Rad51 beschrieben (Zhang et al. 2005). MDC1 könnte somit eine Rolle bei der Rekrutierung von Rad51 an einen DSB spielen. Allerdings sind die zuvor beschriebenen Effekte auf Rad51-Ebene relativ gering, so dass hier auch eine rein unterstützende Funktion von MDC1 denkbar wäre. Eine solche Annahme wird dadurch unterstützt, dass eine MDC1-Defizienz deutlich moderatere Wirkungen zeigt als eine Defizienz klassischer HR-Faktoren wie Rad51 oder BRCA2. So sind MDC1^{-/-}-Mäuse trotz einiger phänotypischer Auffälligkeiten (z. B. eine erhöhte Krebs-Prädisposition) lebensfähig (Xie et al. 2007), wohingegen eine Defizienz von BRCA2 oder Rad51-Paralogen embryonal letal ist (Moynahan 2002, Thacker 2005). Auch das in dieser Arbeit untersuchte γ H2AX-Reparaturverhalten nach MMS macht diesen Unterschied deutlich, denn MDC1-depletierte Zellen (Abb.4.20.A) bildeten einen schwächeren Reparaturdefekt aus als BRCA2- oder Rad51-depletierte Zellen (Abb.4.14).

Zusammengefasst verdeutlichen die durchgeführten γ H2AX-Studien, dass 53BP1 als Bestandteil der Signalwege zur ATM-abhängigen Öffnung des Heterochromatins eine Funktion bei den HR-Vorgängen in der G2-Phase besitzt. Bei der Reparatur MMS-induzierter DSB wird diese Funktion aber nicht benötigt, da das Heterochromatin hier bereits offen vorliegt. MDC1 ist ebenfalls Teil dieser Signalwege, besitzt aber eine zusätzliche Funktion während der HR, die jedoch noch nicht genau bestimmt wurde.

5.7.3 ATR besitzt keine Funktion bei der Reparatur MMS-induzierter DSBs

Neben ATM wurde in dieser Arbeit auch die Bedeutung der Kinase ATR an der Reparatur ein-endiger DSBs nach MMS und an strahleninduzierten DSBs in der G2-Phase anhand von γ H2AX-Reparaturstudien untersucht. Dabei wurde für beide Bedingungen keine Beteiligung von ATR an den Reparaturprozessen beobachtet. Sowohl die γ H2AX- als auch die Rad51-Kinetiken in ATR-defizienten Zellen verhielten sich ähnlich wie in Wildtyp-Zellen (Abb.4.18). Strahleninduzierte DSBs in der G2-Phase stellen ein Substrat für die Aktivierung von ATM dar. ATR wird dagegen an strahleninduzierten DSBs nicht initial aktiviert (Stiff et al. 2004). Während der Resektion der heterochromatischen DSBs in der G2-Phase kommt es aber zu einem Wechsel von einer ATM- zu einer ATR-Aktivierung (Jazayeri et al. 2006, Shiotani + Zou 2009). Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass ATR trotz dieser Aktivierung an den einzelsträngigen Bereichen der Bruchenden keine Bedeutung für die Reparatur strahleninduzierter DSBs in der G2-Phase besitzt (Abb.4.18.C+D). Dies ist konsistent mit Überlebensstudien, in denen keine erhöhte Empfindlichkeit ATR-defizienter Zellen gegenüber ionisierender Strahlung detektiert wurde (O'Driscoll et al. 2003). Die Aktivierung von ATR scheint dagegen lediglich für die Aufrechterhaltung des G2/M-Checkpoints wichtig zu sein, denn in ATR-defizienten Zellen wurde eine frühere Aufhebung des G2/M-Arrest nach Bestrahlung detektiert (Shibata et al. 2010).

Im Gegensatz zur G2-Phase wird ATR in der S-Phase eine deutlich wichtigere Funktion zugeschrieben. Die zelluläre Bedeutung von ATR wird schon daran ersichtlich, dass Nullmutationen im *ATR*-Gen in Mäusen embryonal letal sind (Brown + Baltimore 2000). Man geht davon aus, dass ATR schon für die normale, unbeeinträchtigte S-Phase eine entscheidende regulatorische Funktion hat (Shechter et al. 2004a). Bei replikativem Stress (z. B. durch Behandlung mit S-Phase-schädigenden Agenzien) wird ATR verstärkt aktiviert und kann dann Prozesse der DNA-Schadensantwort einleiten (Shechter et al. 2004b). Bei dieser wichtigen regulatorischen Rolle von ATR in der S-Phase erscheint es etwas überraschend, dass in dieser Arbeit kein Einfluss einer ATR-Defizienz auf das Reparatur- oder das Zellzyklusverhalten nach einer MMS-Behandlung beobachtet wurde (Abb.4.18, Abb.4.19), zumal in früheren Studien eine Empfindlichkeit ATR-depletierter Zellen gegenüber MMS beschrieben wurde (Collis et al. 2003). Wie am Beispiel ATM-defizienter Zellen verdeutlicht wurde,

sind die Ergebnisse von Überlebensstudien aber nicht uneingeschränkt auf die Situation auf γ H2AX-Ebene übertragbar (siehe Kapitel 5.7.1). Daher wäre es denkbar, dass auch ATR-spezifische Langzeiteffekte existieren, die sich zwar in Überlebensexperimenten nicht aber in γ H2AX-Reparaturstudien manifestieren.

Die dabei detektierte uneingeschränkte Reparatur in ATR-defizienten Zellen könnte dennoch ein Zeichen dafür sein, dass zumindest an den MMS-induzierten ein-endigen DSBs die Funktion von ATR durch ATM kompensiert werden kann. Diese Annahme wäre konsistent mit der Beobachtung einer vollständigen Ausbildung MMS-induzierter γ H2AX-Foci in ATR-defizienten Zellen (Abb.4.4.B). Allerdings muss bei all diesen Ergebnissen berücksichtigt werden, dass mit F02-98 hTert-Zellen hier nur eine hypomorphe ATR-Mutante untersucht wurde (O'Driscoll et al. 2003). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte lediglich der Restaktivität von ATR zuzuschreiben sind. Die Beobachtung, dass die Ausbildung an γ H2AX-Foci nach einer MMS-Behandlung in diesen Zellen aber weitgehend unterbunden ist, wenn zusätzlich ATM und die DNA-PK inhibiert wurden (Abb.4.4.B), spricht aber gegen diese Annahme. Dennoch sind weitere Experimente für eine sichere Beurteilung der Rolle von ATR nach einer MMS-Behandlung sinnvoll.

5.8 Ausblick

Mit Hilfe der Zellzyklus-spezifischen γ H2AX-Immunfluoreszenz konnten in der vorliegenden Arbeit viele bestehende Theorien über die Wirkung von MMS bestätigt werden. So verdeutlichen die γ H2AX-Studien, dass sich die DNA-schädigende Wirkung von MMS im relevanten Konzentrationsbereich fast ausschließlich während der S-Phase manifestiert, wenn die Replikation durch SSBs gestört wird, die während der Reparatur MMS-induzierten Basenmethylierungen über den BER-Weg erzeugt werden. Basierend auf zahlreichen Überlebensstudien in den vergangenen Jahren wurde der HR eine entscheidende Funktion bei der Reparatur MMS-induzierter Schäden zugeschrieben. Diese Annahme konnte in dieser Arbeit nicht nur bestätigt werden, die γ H2AX-Analysen unterschiedlicher Reparatur-Mutanten verdeutlichten sogar eine Determinierung MMS-induzierter DSBs für der HR-Weg. Der Prozess des NHEJ trägt dagegen nicht zu Reparatur dieser ein-endigen DSBs bei.

Auch wenn in dieser Arbeit viele existierende Modelle bestätigt wurden und neue Einblicke in die Wirkung von MMS gewonnen werden konnten, bleiben dennoch einige Fragen offen, die in Zukunft beantwortet werden sollen. Ein Schwerpunkt soll dabei auf dem Zusammenspiel von Zellzyklus-Kontrolle und Reparaturvorgängen nach MMS liegen. In dieser Arbeit wurden Hinweise erhalten, dass Zellen nach einer MMS-Behandlung in einem sehr späten Stadium der S-Phase persistieren und die G2-Phase erst dann erreichen, wenn die erzeugten ein-endigen DSBs weitgehend repariert wurden. Wie dieses Verhalten zustande kommt, ist noch unklar, es wurde in dieser Arbeit aber ein Modell postuliert, wonach DNA-Strukturen an

kollabierten Replikationsgabeln oder an Reparatur-Intermediaten eine Progression in die G2-Phase verhindern. Diese Theorie soll in Zukunft weiter überprüft werden. Dazu soll zum einen bestimmt werden, wie ATM- und ATR-abhängige Zellzyklus-Signale zu dem Arrest in der späten S-Phase beitragen. Außerdem soll geklärt werden, warum BRCA2-defiziente Zellen ein anderes Verhalten zeigen als Wildtyp-Zellen und früher in die G2-Phase progressieren. Eine aktuelle Studie hat BRCA2 eine stabilisierende Funktion an arretierten Replikationsgabeln zugeschrieben, die über eine Rad51-Bindedomäne im C-Terminus von BRCA2 vermittelt wird (Schlacher et al. 2011). Anhand von Zellen mit einer C-terminal mutierten BRCA2-Variante soll nun untersucht werden, ob diese stabilisierende Funktion von BRCA2 auch bei den Prozessen nach MMS von Bedeutung ist und ob sie zu dem zuvor beschriebenen Arrest in der späten S-Phase beiträgt.

Die grundlegende Strategie zur weiteren Erforschung der Prozesse an ein-endigen DSBs innerhalb unserer Arbeitsgruppe besteht im Einsatz verschiedener S-Phase-schädigender Agenzien, die sich in ihrer Wirkungsweise unterscheiden. Dazu wurden bereits neue Studien begonnen, in deren Mittelpunkt die Untersuchung der Wirkung von CPT und HU steht. Diese Studien beinhalten die Analyse ähnlicher Endpunkte wie nach MMS (z. B. γ H2AX-Foci, SCEs oder chromosomale Aberrationen). Durch den Vergleich der erhaltenen Daten sollen die unterschiedlichen zellulären Prozesse, die nach diesen Agenzien auftreten, besser charakterisiert werden.

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Reparaturfaktoren, die an der HR in der G2-Phase beteiligt sind, auch eine Rolle an MMS-induzierten DSBs spielen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Faktoren ATM, Artemis und 53BP1 lediglich eine Funktion bei der Reparatur heterochromatischer DSBs in der G2-Phase besitzen. Nach MMS werden diese Faktoren dagegen nicht benötigt. Mit dem Mediatorprotein MDC1 konnte dagegen ein Faktor identifiziert werden, der sowohl nach MMS als auch nach Bestrahlung in der G2-Phase an der HR beteiligt ist. In Zukunft wäre es nicht nur interessant, die Funktion von MDC1 im HR-Vorgang genauer zu bestimmen, die Unterschiede in den genetischen Voraussetzungen für die distinkten HR-Prozesse an ein- oder zwei-endigen DSBs sollen ebenfalls weiter untersucht werden. Hierbei gibt es eine Reihe von Faktoren, deren Untersuchung im Zusammenhang mit S-Phase-schädigenden Agenzien interessant wäre. Dazu zählen zum Beispiel die Resektasen CtIP, BLM und Exo1, die an den initialen Schritten der HR beteiligt sind. Aber auch die Bedeutung der Protein-Gruppe der Resolvasen, die für die Auflösung von Holliday-Strukturen im HR-Prozess verantwortlich sind und zu denen Mus81, Gen1 aber auch BLM zählen, soll untersucht werden. Die unterschiedlichen Wege der Auflösung der Holliday-Struktur sowie die dabei ablaufenden regulatorischen Prozesse sind momentan ein intensiv erforschtes Gebiet. Hier wäre es interessant zu untersuchen, ob Unterschiede in der Bedeutung oder der Regulation der unterschiedlichen Auflösungs-Mechanismen zwischen strahleninduzierten DSBs in der G2-Phase und ein-endigen DSBs oder zwischen den Schäden der unterschiedlichen S-Phase-schädigenden Agenzien bestehen.

6 Literaturverzeichnis

- Abraham RT. 2001.** Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* **15:** 2177-2196
- Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP. 2006.** XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell.* **124:** 301-313.
- Allen C, Kurimasa A, Brenneman MA, Chen DJ, Nickoloff JA. 2002.** DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99:** 3758-3763.
- Bachrati CZ, Hickson ID. 2003.** RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging. *Biochem J.* **374:** 577-606.
- Bakkenist CJ, Kastan MB. 2003.** DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421:** 499-506.
- Barlow JH, Lisby M, Rothstein R. 2008.** Differential regulation of the cellular response to DNA double-strand breaks in G1. *Molecular Cell.* **30:** 73-85.
- Barnes DE. 2002.** DNA damage: air-breaks? *Curr.Biol.* **12:** R262-R264.
- Bartek J, Lukas C, Lukas J. 2004.** Checking on DNA damage in S phase. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **5:** 792-804.
- Bassing CH, Swat W, Alt FW. 2002.** The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* **109 Suppl:** S45-S55.
- Baute J, Depicker A. 2008.** Base excision repair and its role in maintaining genome stability. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **43:** 239-276.
- Beranek DT. 1990.** Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res.* **231:** 11-30.
- Beucher A, Birraux J, Tchouandong L, Barton O, Shibata A, Conrad S, Goodarzi AA, Krempler A, Jeggo PA, Löbrich M. 2009.** ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J.* **28:** 3413-3427.
- Bianchi V, Pontis E, Reichard P. 1986.** Changes of deoxyribonucleoside triphosphate pools induced by hydroxyurea and their relation to DNA synthesis. *J Biol Chem.* **261:** 16037-16042.
- Boddy MN, Gaillard PH, McDonald WH, Shanahan P, Yates JR 3rd, Russell P. 2001.** Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase. *Cell.* **107:** 537-548.
- Brem R, Fernet M, Chapot B, Hall J. 2008.** The methyl methanesulfonate induced S-phase delay in XRCC1-deficient cells requires ATM and ATR DNA Repair (*Amst*). **7:** 849-857.
- Brown EJ, Baltimore D. 2000.** ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev.* **14:** 397-402.
- Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Barraud A, Fondanèche MC, Sanal O, Plebani A, Stéphan JL, Hufnagel M, le Deist F, Fischer A, Durandy A, de Villartay JP, Revy P. 2006.** Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell.* **124:** 287-299.

Bunting SF, Callén E, Wong N, Chen HT, Polato F, Gunn A, Bothmer A, Feldhahn N, Fernandez-Capetillo O, Cao L, Xu X, Deng CX, Finkel T, Nussenzweig M, Stark JM, Nussenzweig A. 2010. 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*. **141**: 243-254.

Burma S, Chen DJ. 2004. Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* **3**: 909-918.

Bzymek M, Thayer NH, Oh SD, Kleckner N, Hunter N. 2010. Double Holliday junctions are intermediates of DNA break repair. *Nature*. **464**: 937-941.

Caldecott KW. 2003. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)*. **2**: 955-969.

Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P, Shall S. 1996. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res*. **24**: 4387-4394.

Caldecott KW, Tucker JD, Stanker LH, Thompson LH. 1995. Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex in vitro and its absence from mutant hamster cells. *Nucleic Acids Res*. **23**: 4836-4843.

Calléja F, Jansen JG, Vrieling H, Laval F, van Zeeland AA. 1999. Modulation of the toxic and mutagenic effects induced by methyl methanesulfonate in Chinese hamster ovary cells by overexpression of the rat N-alkylpurine-DNA glycosylase. *Mutat Res*. **425**: 185-94.

Chaganti RS, Schonberg S, German J. 1974. A manyfold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **71**: 4508-4512.

Chang C, Biedermann KA, Mezzina M, Brown JM. 1993. Characterization of the DNA double strand break repair defect in scid mice. *Cancer Res*. **53**: 1244-1248.

Chen BP, Chan DW, Kobayashi J, Burma S, Asaithamby A, Morotomi-Yano K, Botvinick E, Qin J, Chen DJ. 2005. Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem*. **280**: 14709-14715.

Chen AY, Liu LF. 1994. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **34**: 191-218.

Chen XB, Melchionna R, Denis CM, Gaillard PH, Blasina A, Van de Weyer I, Boddy MN, Russell P, Vialard J, McGowan CH. 2001. Human Mus81-associated endonuclease cleaves Holliday junctions in vitro. *Mol Cell*. **8**: 1117-1127.

Chen BP, Uematsu N, Kobayashi J, Lerenthal Y, Krempler A, Yajima H, Löbrich M, Shiloh Y, Chen DJ. 2007. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *J Biol Chem*. **282**: 6582-6587.

Choy JS, Kron SJ. 2002. NuA4 subunit Yng2 function in intra-S-phase DNA damage response. *Mol Cell Biol*. **22**: 8215-8225.

Cliby WA, Roberts CJ, Cimprich KA, Stringer CM, Lamb JR, Schreiber SL, Friend SH. 1998. Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *EMBO J*. **17**: 159-169.

Collis SJ, Swartz MJ, Nelson WG, DeWeese TL. 2003. Enhanced radiation and chemotherapy-mediated cell killing of human cancer cells by small inhibitory RNA silencing of DNA repair factors. *Cancer Res*. **63**: 1550-1554.

Constantinou A, Chen XB, McGowan CH, West SC. 2002. Holliday junction resolution in human cells: two junction endonucleases with distinct substrate specificities. *EMBO J*. **21**: 5577-5585.

-
- Coquerelle T, Dosch J, Kaina B. 1995.** Overexpression of N-methylpurine-DNA glycosylase in Chinese hamster ovary cells renders them more sensitive to the production of chromosomal aberrations by methylating agents--a case of imbalanced DNA repair. *Mutat Res.* **336**: 9-17.
- Davies SL, North PS, Hickson ID. 2007.** Role for BLM in replication-fork restart and suppression of origin firing after replicative stress. *Nat Struct Mol Biol.* **14**: 677-679.
- Deans AJ, West SC. 2011.** DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer.* **11**: 467-480.
- Debiak M, Nikolova T, Kaina B. 2004.** Loss of ATM sensitizes against O6-methylguanine triggered apoptosis, SCEs and chromosomal aberrations. *DNA Repair (Amst).* **3**: 359-368.
- Deckbar D, Birraux J, Krempler A, Tchouandong L, Beucher A, Walker S, Stiff T, Jeggo P, Löbrich M. 2007.** Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *J Cell Biol.* **176**: 749-755.
- Deckbar D, Jeggo PA, Löbrich M. 2011.** Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **46**: 271-283.
- de Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C. 2001.** Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell.* **8**: 1129-1135.
- Dendouga N, Gao H, Moechars D, Janicot M, Vialard J, McGowan CH. 2005.** Disruption of murine Mus81 increases genomic instability and DNA damage sensitivity but does not promote tumorigenesis. *Mol Cell Biol.* **25**: 7569-7579.
- Ding Q, Reddy YV, Wang W, Woods T, Douglas P, Ramsden DA, Lees-Miller SP, Meek K. 2003.** Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* **23**: 5836-5848.
- Doe CL, Ahn JS, Dixon J, Whitby MC. 2002.** Mus81-Eme1 and Rqh1 involvement in processing stalled and collapsed replication forks. *J Biol Chem.* **277**: 32753-32759.
- Domínguez I, Daza P, Natarajan AT, Cortés F. 1998.** A high yield of translocations parallels the high yield of sister chromatid exchanges in the CHO mutant EM9. *Mutat Res.* **398**: 67-73.
- Donzelli M, Draetta GF. 2003.** Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep.* **4**: 671-677.
- Drablos F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbo CB, Kavli B, Bratlie MS, Peña-Díaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE. 2004.** Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst).* **3**: 1389-1407.
- Eggermont AM, Kirkwood JM. 2004.** Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? *Eur J Cancer.* **40**: 1825-1836.
- Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon DJ, Ciocchi S, Proytcheva M, German J. 1995.** The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell.* **83**: 655-666.
- Engelward BP, Allan JM, Dreslin AJ, Kelly JD, Wu MM, Gold B, Samson LD. 1998.** A chemical and genetic approach together define the biological consequences of 3-methyladenine lesions in the mammalian genome. *J Biol Chem.* **273**: 5412-5418.
- Ensminger M, Conrad S, Beucher A, Taucher-Scholz G, Löbrich M. 2010.** DNA Damage after High-LET Exposure. *GSI Annual Report.*
- Esashi F, Christ N, Gannon J, Liu Y, Hunt T, Jasin M, West SC. 2005.** CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature.* **434**: 598-604.

Falnes PO. 2004. Repair of 3-methylthymine and 1-methylguanine lesions by bacterial and human AlkB proteins. *Nucleic Acids Res.* **32**: 6260-6267.

Feng Z, Zhang J. 2011. A dual role of BRCA1 in two distinct homologous recombination mediated repair in response to replication arrest. *Nucleic Acids Res.* [Epub ahead of print]

Formosa T, Alberts BM. 1986. DNA synthesis dependent on genetic recombination: characterization of a reaction catalyzed by purified bacteriophage T4 proteins. *Cell.* **47**: 793-806.

Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, Sobol RW, Wilson SH, Dogliotti E. 1998. Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry.* **37**: 3575-3580.

Frankenberg-Schwager M. 1990. Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells. *Radiat. Environ. Biophys.* **29**: 273-292.

Frankenberg-Schwager M, Frankenberg D. 1990. DNA double-strand breaks: their repair and relationship to cell killing in yeast. *Int. J. Radiat. Biol.* **58**: 569-575.

Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T. 2006. DNA repair and mutagenesis. *ASM Press*, Washington, D.C.

Froget B, Blaisonneau J, Lambert S, Baldacci G. 2008. Cleavage of stalled forks by fission yeast Mus81/Eme1 in absence of DNA replication checkpoint. *Mol Biol Cell.* **19**: 445-546.

Fuller LF, Painter RB. 1988. A Chinese hamster ovary cell line hypersensitive to ionizing radiation and deficient in repair replication. *Mutat Res.* **193**: 109-121.

Gellert M. 2002. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 101-132.

German J, Schonberg S, Louie E, Chaganti RS. 1977. Bloom's syndrome. IV. Sister-chromatid exchanges in lymphocytes. *Am J Hum Genet.* **29**: 248-255.

Getts RC, Stamato TD. 1994. Absence of a Ku-like DNA end binding activity in the xrs double-strand DNA repair-deficient mutant. *J Biol Chem.* **269**: 15981-15984.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* **51**: 1417-1423.

Glassner BJ, Weeda G, Allan JM, Broekhof JL, Carls NH, Donker I, Engelward BP, Hampson RJ, Hersmus R, Hickman MJ, Roth RB, Warren HB, Wu MM, Hoeijmakers JH, Samson LD. 1999. DNA repair methyltransferase (Mgmt) knockout mice are sensitive to the lethal effects of chemotherapeutic alkylating agents. *Mutagenesis.* **14**: 339-347.

Goldmacher VS, Cuzick RA Jr, Thilly WG. 1986. Isolation and partial characterization of human cell mutants differing in sensitivity to killing and mutation by methylnitrosourea and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J Biol Chem.* **261**: 12462-12471.

Goodarzi AA, Jeggo P, Löbrich M. 2010. The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. *DNA Repair (Amst).* **9**: 1273-1282.

Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Löbrich M, Jeggo PA. 2008. ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell.* **31**: 167-177.

Goodarzi AA, Yu Y, Riballo E, Douglas P, Walker SA, Ye R, Härer C, Marchetti C, Morrice N, Jeggo PA, Lees-Miller SP. 2006. DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J.* **25**: 3880-3889.



- Goodhead DT. 1994.** Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int.J.Radiat.Biol.* **65**: 7-17.
- Goodship J, Gill H, Carter J, Jackson A, Splitt M, Wright M. 2000.** Autozygosity mapping of a seckel syndrome locus to chromosome 3q22. 1-q24. *Am J Hum Genet.* **67**: 498-503.
- Gotoh E, Durante M. 2006.** Chromosome condensation outside of mitosis: mechanisms and new tools. *J Cell Physiol.* **209**: 297-304.
- Groth P, Ausländer S, Majumder MM, Schultz N, Johansson F, Petermann E, Helleday T. 2010.** Methylated DNA causes a physical block to replication forks independently of damage signalling, O(6)-methylguanine or DNA single-strand breaks and results in DNA damage. *J Mol Biol.* **402**: 70-82.
- Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. 1994.** Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science.* **265**: 103-106.
- Gudmundsdottir K, Ashworth A. 2006.** The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene.* **25**: 5864-5874.
- Hall EJ, Giaccia AJ. 2006.** Radiobiology for the Radiologist. 6. Auflage. *Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia USA*
- Hanada K, Budzowska M, Davies SL, van Drunen E, Onizawa H, Beverloo HB, Maas A, Essers J, Hickson ID, Kanaar R. 2007.** The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol.* **14**: 1096-1104.
- Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. 2008.** DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* **8**: 193-204.
- Heller RC, Marians KJ. 2006.** Replisome assembly and the direct restart of stalled replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**: 932-943.
- Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J. 2010.** Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet.* **44**: 113-139.
- Heyer WD, Li X, Rolfmeier M, Zhang XP. 2006.** Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res.* **34**: 4115-4125.
- Higgins NP, Kato K, Strauss B. 1976.** A model for replication repair in mammalian cells. *J Mol Biol.* **101**: 417-525.
- Hinz JM, Tebbs RS, Wilson PF, Nham PB, Salazar EP, Nagasawa H, Urbin SS, Bedford JS, Thompson LH. 2006.** Repression of mutagenesis by Rad51D-mediated homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* **34**: 1358-1368.
- Hiyama T, Katsura M, Yoshihara T, Ishida M, Kinomura A, Tonda T, Asahara T, Miyagawa K. 2006.** Haploinsufficiency of the Mus81-Eme1 endonuclease activates the intra-S-phase and G2/M checkpoints and promotes rereplication in human cells. *Nucleic Acids Res.* **34**: 880-892.
- Hoadley KA, Xu D, Xue Y, Satyshur KA, Wang W, Keck JL. 2010.** Structure and cellular roles of the RMI core complex from the bloom syndrome dissolvasome. *Structure.* **18**: 1149-1158.
- Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M. 2002.** Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu.Rev.Immunol.* **20**: 165-196.
- Horton JK, Stefanick DF, Zeng JY, Carrozza MJ, Wilson SH. 2011.** Requirement for NBS1 in the S phase checkpoint response to DNA methylation combined with PARP inhibition. *DNA Repair (Amst).* **10**: 225-234.

-
- Horton JK, Watson M, Stefanick DF, Shaughnessy DT, Taylor JA, Wilson SH. 2008.** XRCC1 and DNA polymerase beta in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. *Cell Res.* **18**: 48-63.
- Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, Ikeda H, Fox EA, and D'Andrea AD. 2002.** Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* **297**: 606-609.
- Huen MS, Grant R, Manke I, Minn K, Yu X, Yaffe MB, Chen J. 2007.** RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell.* **131**: 901-914.
- Huertas P, Cortes-Ledesma F, Sartori AA, Aguilera A, Jackson SP. 2008.** CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature.* **455**: 689-U86.
- Huertas P, Jackson SP. 2009.** Human CtIP Mediates Cell Cycle Control of DNA End Resection and Double Strand Break Repair. *Journal of Biological Chemistry.* **284**: 9558-9565.
- Iliakis G, Blöcher D, Metzger L, Pantelias G. 1991.** Comparison of DNA double-strand break rejoining as measured by pulsed field gel electrophoresis, neutral sucrose gradient centrifugation and non-unwinding filter elution in irradiated plateau-phase CHO cells. *Int J Radiat Biol.* **59**: 927-939.
- Interthal H, Heyer WD. 2000.** MUS81 encodes a novel helix-hairpin-helix protein involved in the response to UV- and methylation-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* **263**: 812-827.
- Ip SC, Rass U, Blanco MG, Flynn HR, Skehel JM, West SC. 2008.** Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature.* **456**: 357-361.
- Ira G, Malkova A, Liberi G, Foiani M, Haber JE. 2003.** Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell.* **115**: 401-411.
- Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GC, Lukas J, Jackson SP. 2006.** ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol.* **8**: 37-45
- Jeggo PA, Geuting V, Löbrich M. 2011.** The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair. *Radiother Oncol.* **101**: 7-12
- Jeggo PA, Löbrich M. 2005.** Artemis links ATM to double strand break rejoining. *Cell Cycle* **4**: 359-362.
- Jeggo PA, Löbrich M. 2006.** Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. *DNA Repair (Amst).* **5**: 1192-1198.
- Jensen RB, Carreira A, Kowalczykowski SC. 2010.** Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature.* **467**: 678-683.
- Johnson RD, Jasin M. 2001.** Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochem.Soc.Trans.* **29**: 196-201.
- Jungmichel S, Stucki M. 2010.** MDC1: The art of keeping things in focus. *Chromosoma.* **119**: 337-349.
- Kadyk LC, Hartwell LH. 1992.** Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **132**: 387-402.
- Kai M, Boddy MN, Russell P, Wang TS. 2005.** Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress. *Genes Dev.* **19**: 919-932.

-
- Kaina B. 2004.** Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and still a far way to go. *Cytogenet Genome Res.* **104**: 77-86.
- Karow JK, Constantinou A, Li JL, West SC, Hickson ID. 2000.** The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of holliday junctions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**: 6504-6508.
- Kegel P, Riballo E, Kühne M, Jeggo PA, Löbrich M. 2007.** X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA Repair (Amst).* **6**: 1692-1697.
- Kim ST, Lim DS, Canman CE, Kastan MB. 1999.** Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J.Biol.Chem.* **274**: 37538-37543.
- Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. 2008.** Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* **36**: 5678-5694.
- Kogoma T. 1997.** Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 212-238.
- Krejci L, Van Komen S, Li Y, Villemain J, Reddy MS, Klein H, Ellenberger T, Sung P. 2003.** DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature.* **423**: 305-309.
- Krempler A, Deckbar D, Jeggo PA, Löbrich M. 2007.** An imperfect G2M checkpoint contributes to chromosome instability following irradiation of S and G2 phase cells. *Cell Cycle.* **6**: 1682-1686.
- Krogh BO, Symington LS. 2004.** Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet.* **38**: 233-271.
- Kühne M, Riballo E, Rief N, Rothkamm K, Jeggo PA, Löbrich M. 2004.** A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res.* **64**: 500-508.
- Kurimasa A, Kumano S, Boubnov NV, Story MD, Tung CS, Peterson SR, Chen DJ. 1999.** Requirement for the kinase activity of human DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA strand break rejoining. *Mol Cell Biol.* **19**: 3877-3884.
- Langerak P, Mejia-Ramirez E, Limbo O, Russell P. 2011.** Release of Ku and MRN from DNA ends by Mre11 nuclease activity and Ctp1 is required for homologous recombination repair of double-strand breaks. *PLoS Genet.* **7**: e1002271.
- Larson K, Sahm J, Shenkar R, Strauss B. 1985.** Methylation-induced blocks to *in Vitro* DNA replication. *Mutat. Res.* **150**: 77-84.
- Lee JH, Paull TT. 2005.** ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science.* **308**: 551-554.
- Lees-Miller SP, Chen YR, Anderson CW. 1990.** Human cells contain a DNA-activated protein kinase that phosphorylates simian virus 40 T antigen, mouse p53, and the human Ku autoantigen. *Mol.Cell Biol.* **10**: 6472-6481.
- Levin DS, McKenna AE, Motycka TA, Matsumoto Y, Tomkinson AE. 2000.** Interaction between PCNA and DNA ligase I is critical for joining of Okazaki fragments and long-patch base-excision repair. *Curr Biol.* **10**: 919-922.
- Li S, Ting NS, Zheng L, Chen PL, Ziv Y, Shiloh Y, Lee EY, Lee WH. 2000.** Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature.* **406**: 210-215.
- Löbrich M, Ikpeme S, Haub P, Weber KJ, Kiefer J. 1993.** DNA double-strand break induction in yeast by X-rays and alpha-particles measured by pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol.* **64**: 539-546.

Löbrich M, Rydberg B, Cooper PK. 1995. Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: joining of correct and incorrect ends. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92:** 12050-12054.

Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, Barton O, Jeggo PA. 2010. gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle.* **9:** 662-669

Loechler EL, Green CL, Essigmann JM. 1984. In vivo mutagenesis by O6-methylguanine built into a unique site in a viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81:** 6271-6275.

Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, Manis JP, van Deursen J, Nussenzweig A, Paull TT, Alt FW, Chen J. 2006. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell.* **21:** 187-200.

Lukas C, Melander F, Stucki M, Falck J, Bekker-Jensen S, Goldberg M, Lerenthal Y, Jackson SP, Bartek J, Lukas J. 2004. Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J.* **23:** 2674-2683.

Lukas C, Savic V, Bekker-Jensen S, Doil C, Neumann B, Pedersen RS, Grøfte M, Chan KL, Hickson ID, Bartek J, Lukas J. 2011. 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat Cell Biol.* **13:** 243-253.

Lundin C, Erixon K, Arnaudeau C, Schultz N, Jenssen D, Meuth M, Helleday T. 2002. Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **22:** 5869-5878.

Lundin C, North M, Erixon K, Walters K, Jenssen D, Goldman AS, Helleday T. 2005. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* **33:** 3799-3811.

Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. 2002. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* **108:** 781-794.

Ma W, Westmoreland JW, Gordenin DA, Resnick MA. 2011. Alkylation base damage is converted into repairable double-strand breaks and complex intermediates in G2 cells lacking AP endonuclease. *PLoS Genet.* **7:** e1002059.

Machwe A, Karale R, Xu X, Liu Y, Orren DK. 2011. The Werner and Bloom syndrome proteins help resolve replication blockage by converting (regressed) holliday junctions to functional replication forks. *Biochemistry.* **50:** 6774-6788.

Machwe A, Xiao L, Groden J, Orren DK. 2006. The Werner and Bloom syndrome proteins catalyze regression of a model replication fork. *Biochemistry.* **45:** 13939-13946.

Marmorstein LY, Ouchi T, Aaronson SA. 1998. The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95:** 13869-13874.

Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER III, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, and Elledge SJ. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science.* **316:** 1160-1166.

McGill C, Shafer B, . Strathern. 1989. Coconversion of flanking sequences with homothallic switching. *Cell.* **57:** 459-467.

McGlynn P, Lloyd RG. 2002. Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3:** 859-870.

McPherson JP, Lemmers B, Chahwan R, Pamidi A, Migon E, Matysiak-Zablocki E, Moynahan ME, Essers J, Hanada K, Poonepalli A, Sanchez-Sweatman O, Khokha R, Kanaar R, Jasin M, Hande MP, Hakem R. 2004. Involvement of mammalian Mus81 in genome integrity and tumor suppression. *Science*. **304**: 1822-1826.

Meek K, Douglas P, Cui X, Ding Q, Lees-Miller SP. 2007. trans Autophosphorylation at DNA-dependent protein kinase's two major autophosphorylation site clusters facilitates end processing but not end joining. *Mol Cell Biol*. **27**: 3881-3890.

Meister P, Taddei A, Ponti A, Baldacci G, Gasser SM. 2007. Replication foci dynamics: replication patterns are modulated by S-phase checkpoint kinases in fission yeast. *EMBO J*. **26**: 1315-1326.

Menzel T, Nähse-Kumpf V, Kousholt AN, Klein DK, Lund-Andersen C, Lees M, Johansen JV, Syljuåsen RG, Sørensen CS. 2011. A genetic screen identifies BRCA2 and PALB2 as key regulators of G2 checkpoint maintenance. *EMBO Rep*. **12**: 705-712.

Mimitou EP, Symington LS. 2008. Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature*. **455**: 770-774.

Mimitou EP, Symington LS. 2009. Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends Biochem Sci*. **34**: 264-272.

Moshous D, Callebaut I, De Chasseval R, Poinsignon C, Villey I, Fischer A, de Villartay JP. 2003. The V(D)J recombination/DNA repair factor artemis belongs to the metallo-beta-lactamase family and constitutes a critical developmental checkpoint of the lymphoid system. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. **987**: 150-157.

Mosig G. 1987. The essential role of recombination in phage T4 growth. *Annu. Rev. Genet*. **21**: 347–371.

Moynahan ME. 2002. The cancer connection: BRCA1 and BRCA2 tumor suppression in mice and humans. *Oncogene*. **21**: 8994-9007.

Moynahan ME, Jasin M. 2010. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **11**: 196-207.

Munro TR. 1970. The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat. Res*. **42**: 451-470.

Nasmyth K, Haering CH. 2009. Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet*. **43**: 525-558.

Nikolova T, Ensminger M, Löbrich M, Kaina B. 2010. Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methyl methanesulfonate. *DNA Repair (Amst)*. **9**: 1050-1063

Nimonkar AV, Ozsoy AZ, Genschel J, Modrich P, Kowalczykowski SC. 2008. Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**: 16906-16911.

Noon AT, Shibata A, Rief N, Löbrich M, Stewart GS, Jeggo PA, Goodarzi AA. 2010. 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. *Nat Cell Biol*. **12**: 177-184.

O'Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, Jeggo PA, Goodship JA. 2003. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat.Genet*. **33**: 497-501.

Ohmori H, Hanafusa T, Ohashi E, Vaziri C. 2009. Separate roles of structured and unstructured regions of Y-family DNA polymerases. *Adv Protein Chem Struct Biol*. **78**: 99-146.

-
- Okazaki R, Okazaki T, Sakabe K, Sugimoto K, Sugino A. 1968.** Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **59**: 598-605.
- Orr-Weaver TL, Szostak JW. 1983.** Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **80**: 4417-4421.
- Osborne MR, Phillips DH. 2000.** Preparation of a methylated DNA standard, and its stability on storage. *Chem Res Toxicol*. **13**: 257-261.
- Osman F, Whitby MC. 2007.** Exploring the roles of Mus81-Eme1/Mms4 at perturbed replication forks. *DNA Repair*. **6**: 1004-1017.
- Paik J, Duncan T, Lindahl T, Sedgwick B. 2005.** Sensitization of human carcinoma cells to alkylating agents by small interfering RNA suppression of 3-alkyladenine-DNA glycosylase. *Cancer Res*. **65**: 10472-10477.
- Panier S, Durocher D. 2009.** Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*. **8**: 436-443.
- Paques F, Haber JE. 1999.** Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **63**: 349-404.
- Pascucci B, Russo MT, Crescenzi M, Bignami M, Dogliotti E. 2005.** The accumulation of MMS-induced single strand breaks in G1 phase is recombinogenic in DNA polymerase beta defective mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. **33**: 280-288.
- Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. 2000.** A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr.Biol*. **10**: 886-895.
- Petermann E, Orta ML, Issaeva N, Schultz N, Helleday T. 2010.** Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol Cell*. **37**: 492-502.
- Petermann E, Helleday T. 2010.** Pathways of mammalian replication fork restart. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **11**: 683-687.
- Petermann E, Helleday T, Caldecott KW. 2008.** Claspin promotes normal replication fork rates in human cells. *Mol Biol Cell*. **19**: 2373-2378.
- Pfeiffer P, Goedecke W, Kuhfittig-Kulle S, Obe G. 2004.** Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenet.Genome Res*. **104**: 7-13.
- Plosky BS, Woodgate R. 2004.** Switching from high-fidelity replicases to low-fidelity lesion-bypass polymerases. *Curr.Opin.Genet.Dev*. **14**: 113-119.
- Pommier Y. 2004.** Camptothecins and topoisomerase I: a foot in the door. Targeting the genome beyond topoisomerase I with camptothecins and novel anticancer drugs: importance of DNA replication, repair and cell cycle checkpoints. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. **4**: 429-434.
- Pommier Y, Pourquier P, Fan Y, Strumberg D. 1998.** Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim.Biophys.Acta*. **1400**: 83-105.
- Prakash S, Johnson RE, Prakash L. 2005.** Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu.Rev.Biochem*. **74**: 317-353.

Prasad R, Dianov GL, Bohr VA, Wilson SH. 2000. FEN1 stimulation of DNA polymerase beta mediates an excision step in mammalian long patch base excision repair. *J Biol Chem.* **275**: 4460-4466.

Prigent C, Dimitrov S. 2003. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci.* **116**: 3677-3685.

Quennet V, Beucher A, Barton O, Takeda S, Löbrich M. 2011. CtIP and MRN promote non-homologous end-joining of etoposide-induced DNA double-strand breaks in G1. *Nucleic Acids Res.* **39**: 2144-2152.

Ralf C, Hickson ID, Wu L. 2006. The Bloom's syndrome helicase can promote the regression of a model replication fork. *J Biol Chem.* **281**: 22839-22846.

Rampakakis E, Di Paola D, Chan MK, Zannis-Hadjopoulos M. 2009. Dynamic changes in chromatin structure through post-translational modifications of histone H3 during replication origin activation. *J Cell Biochem.* **108**: 400-407.

Rass U, Compton SA, Matos J, Singleton MR, Ip SC, Blanco MG, Griffith JD, West SC. 2010. Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein. *Genes Dev.* **24**: 1559-1569.

Reynaud CA, Aoufouchi S, Faili A, Weill JC. 2003. What role for AID: mutator, or assembler of the immunoglobulin mutasome? *Nat.Immunol.* **4**: 631-638.

Riballo E, Critchlow SE, Teo SH, Doherty AJ, Priestley A, Broughton B, Kysela B, Beamish H, Plowman N, Arlett CF, Lehmann AR, Jackson SP, Jeggo PA. 1999. Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr Biol.* **9**: 699-702.

Riballo E, Kühne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson SP, Gennery A, Jeggo PA, Löbrich M. 2004. A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol.Cell.* **16**: 715-724.

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J.Biol.Chem.* **273**: 5858-5868.

Roos WP, Nikolova T, Quiros S, Naumann SC, Kiedron O, Zdzienicka MZ, Kaina B. 2009. Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O(6)-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs. *DNA Repair (Amst).* **8**: 72-86.

Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M. 2003. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol.Cell Biol.* **23**: 5706-5715.

Rothkamm K, Löbrich M. 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**: 5057-5062.

Rupp WD, Wilde CE 3rd, Reno DL, Howard-Flanders P. 1971. Exchanges between DNA strands in ultraviolet-irradiated Escherichia coli. *J Mol Biol.* **61**: 25-44.

Saintigny Y, Delacote F, Vares G, Petitot F, Lambert S, Aeverbeck D, Lopez BS. 2001. Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *EMBO J.* **20**: 3861-3870.

Samson L, Cairns J. 1977. A new pathway for DNA repair in Escherichia coli. *Nature.* **267**: 281-283.

Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP. 2007. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature.* **450**: 509-514.

Sasaki T, Tian H, Kukita Y, Inazuka M, Tahira T, Imai T, Yamauchi M, Saito T, Hori T, Hashimoto-Tamaoki T, Komatsu K, Nikaido O, Hayashi K. 1998. ATM mutations in patients with ataxia telangiectasia screened by a hierarchical strategy. *Hum Mutat.* **12**: 186-195.

Scharer OD. 2005. DNA interstrand crosslinks: natural and drug-induced DNA adducts that induce unique cellular responses. *Chembiochem.* **6**: 27-32.

Schild D, Lio YC, Collins DW, Tsomondo T, Chen DJ. 2000. Evidence for simultaneous protein interactions between human Rad51 paralogs. *J.Biol.Chem.* **275**: 16443-16449.

Schlacher K, Christ N, Siaud N, Egashira A, Wu H, Jasin M. 2011. Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell.* **145**: 529-542.

Schwacha A, Kleckner N. 1995. Identification of double Holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. *Cell.* **83**: 783-791.

Schwartz EK, Heyer WD. 2011. Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. *Chromosoma.* **120**: 109-127.

Scorah J, McGowan CH. 2009. Claspin and Chk1 regulate replication fork stability by different mechanisms. *Cell Cycle.* **8**: 1036-1043.

Sedgwick B, Lindahl T. 2002. Recent progress on the Ada response for inducible repair of DNA alkylation damage. *Oncogene* **21**: 8886-8894.

Sengupta S, Harris CC. 2005. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**: 44-55.

Shen MR, Zdzienicka MZ, Mohrenweiser H, Thompson LH, Thelen MP. 1998. Mutations in hamster single-strand break repair gene XRCC1 causing defective DNA repair. *Nucleic Acids Res.* **26**: 1032-1037.

Shechter D, Costanzo V, Gautier J. 2004a. ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nat.Cell Biol.* **6**: 648-655.

Shechter D, Costanzo V, Gautier J. 2004b. Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA Repair (Amst)* **3**: 901-908.

Shiotani B, Zou L. 2009. Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. *Mol Cell.* **33**: 547-558.

Shivji MK, Venkitaraman AR. 2004. DNA recombination, chromosomal stability and carcinogenesis: insights into the role of BRCA2. *DNA Repair (Amst)* **3**: 835-843.

Shibata A, Barton O, Noon AT, Dahm K, Deckbar D, Goodarzi AA, Löbrich M, Jeggo PA. 2010. Role of ATM and the damage response mediator proteins 53BP1 and MDC1 in the maintenance of G(2)/M checkpoint arrest. *Mol Cell Biol.* **30**: 3371-3383.

Shibata A, Conrad S, Birraux J, Geuting V, Barton O, Ismail A, Kakarougkas A, Meek K, Taucher-Scholz G, Löbrich M, Jeggo PA. 2011. Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J.* **30**: 1079-1092.

Sisken JE, Morasca L. 1965. Intrapopulation kinetics of the mitotic cycle. *J Cell Biol.* **25**: 179-189.

Smiraldo PG, Gruver AM, Osborn JC, Pittman DL. 2005. Extensive chromosomal instability in Rad51d-deficient mouse cells. *Cancer Res.* **65**: 2089-2096.

-
- Sobol RW, Horton JK, Kühn R, Gu H, Singhal RK, Prasad R, Rajewsky K, Wilson SH. 1996.** Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature*. **379**: 183-186.
- Sobol RW, Kartalou M, Almeida KH, Joyce DF, Engelward BP, Horton JK, Prasad R, Samson LD, Wilson SH. 2003.** Base excision repair intermediates induce p53-independent cytotoxic and genotoxic responses. *J Biol Chem*. **278**: 39951-39959.
- Sobol RW, Prasad R, Evenski A, Baker A, Yang XP, Horton JK, Wilson SH. 2000.** The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. *Nature*. **405**: 807-180.
- Sobol RW, Watson DE, Nakamura J, Yakes FM, Hou E, Horton JK, Ladapo J, Van Houten B, Swenberg JA, Tindall KR, Samson LD, Wilson SH. 2002.** Mutations associated with base excision repair deficiency and methylation-induced genotoxic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**: 6860-6865.
- Sogo JM, Lopes M, Foiani M. 2002.** Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science*. **297**: 599-602.
- Sorensen CS, Hansen LT, Dziegielewski J, Syljuasen RG, Lundin C, Bartek J, Helleday T. 2005.** The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat. Cell Biol*. **7**: 195-201.
- Sorensen CS, Syljuasen RG, Falck J, Schroeder T, Ronnstrand L, Khanna KK, Zhou BB, Bartek J, Lukas J. 2003.** Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell*. **3**: 247-258.
- Srivastava DK, Berg BJ, Prasad R, Molina JT, Beard WA, Tomkinson AE, Wilson SH. 1998.** Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps. *J Biol Chem*. **273**: 21203-21209.
- Staszewski O, Nikolova T, Kaina B. 2008.** Kinetics of gamma-H2AX focus formation upon treatment of cells with UV light and alkylating agents. *Environ Mol Mutagen*. **49**: 734-740.
- Stewart GS, Panier S, Townsend K, Al-Hakim AK, Kolas NK, Miller ES, Nakada S, Ylanko J, Olivarius S, Mendez M, Oldreive C, Wildenhain J, Tagliaferro A, Pelletier L, Taubenheim N, Durandy A, Byrd PJ, Stankovic T, Taylor AM, Durocher D. 2009.** The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell*. **136**: 420-434.
- Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA. 2004.** ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res*. **64**: 2390-2396.
- Strumberg D, Pilon AA, Smith M, Hickey R, Malkas L, Pommier Y. 2000.** Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol. Cell Biol*. **20**: 3977-3987.
- Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP. 2005.** MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*. **123**: 1213-1226.
- Stucki M, Jackson SP. 2004.** MDC1/NFBD1: a key regulator of the DNA damage response in higher eukaryotes. *DNA Repair (Amst)*. **3**: 953-957.
- Symington LS. 2002.** Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev*. **66**: 630-670.
- Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW. 1983.** The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*. **33**: 25-35.

Taccioli GE, Gottlieb TM, Blunt T, Priestley A, Demengeot J, Mizuta R, Lehmann AR, Alt FW, Jackson SP, Jeggo PA. 1994. Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science*. **265**: 1442-1445.

Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S. 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J*. **17**: 5497-5508.

Takata M, Sasaki MS, Tachiiri S, Fukushima T, Sonoda E, Schild D, Thompson LH, Takeda S. 2001. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol*. **21**: 2858-2866.

Taylor ER, McGowan CH. 2008. Cleavage mechanism of human Mus81-Eme1 acting on Holliday-junction structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**: 3757-3762.

Taylor AM, Metcalfe JA, Thick J, Mak YF. 1996. Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood*. **87**: 423-438.

Tebbs RS, Flannery ML, Meneses JJ, Hartmann A, Tucker JD, Thompson LH, Cleaver JE, Pedersen RA. 1999. Requirement for the Xrcc1 DNA base excision repair gene during early mouse development. *Dev Biol*. **208**: 513-529.

Thacker J. 2005. The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett*. **219**: 125-135.

Thaler DS, Stahl MM, Stahl FW. 1987. Tests of the double-strand-break repair model for red-mediated recombination of phage lambda and plasmid lambda dv. *Genetics*. **116**: 501-511.

Thompson LH, Brookman KW, Dillehay LE, Carrano AV, Mazrimas JA, Mooney CL, Minkler JL. 1982. A CHO-cell strain having hypersensitivity to mutagens, a defect in DNA strand-break repair, and an extraordinary baseline frequency of sister-chromatid exchange. *Mutat Res*. **95**: 427-440.

Thorslund T, McIlwraith MJ, Compton SA, Lekontsev S, Petronczki M, Griffith JD, West SC. 2010. The breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol*. **17**: 1263-1265.

Ting NS, Lee WH. 2004. The DNA double-strand break response pathway: becoming more BRCAish than ever. *DNA Repair (Amst)*. **3**: 935-944.

Tran PT, Erdeniz N, Symington LS, Liskay RM. 2004. EXO1-A multi-tasking eukaryotic nuclease. *DNA Repair (Amst)*. **3**: 1549-1559.

Tsuzuki T, Sakumi K, Shiraishi A, Kawate H, Igarashi H, Iwakuma T, Tominaga Y, Zhang S, Shimizu S, Ishikawa T et AL. 1996. Targeted disruption of the DNA repair methyltransferase gene renders mice hypersensitive to alkylating agent. *Carcinogenesis*. **17**: 1215-1220.

Uematsu N, Weterings E, Yano K, Morotomi-Yano K, Jakob B, Taucher-Scholz G, Mari PO, van Gent DC, Chen BP, Chen DJ. 2007. Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*. **177**: 219-229.

Usdin K, Woodford KJ. 1995. CGG repeats associated with DNA instability and chromosome fragility form structures that block DNA synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res*. **23**: 4202-4209.

Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y. 2003. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J*. **22**: 5612-5621.

van den Heuvel S, Harlow E. 1993. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science*. **262**: 2050-2054.

-
- van Attikum H, Gasser SM. 2009.** Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol.* **19**: 207-217.
- van Brabant AJ, Ye T, Sanz M, German III JL, Ellis NA, Holloman WK. 2000.** Binding and melting of D-loops by the Bloom syndrome helicase. *Biochemistry.* **39**: 14617-14625.
- Vasileva A, Jessberger R. 2005.** Precise hit: adeno-associated virus in gene targeting. *Nat Rev Microbiol.* **3**: 837-847.
- Veaute X, Jeusset J, Soustelle C, Kowalczykowski SC, Le Cam E, Fabre F. 2003.** The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature.* **423**: 309-312.
- Vidal AE, Boiteux S, Hickson ID, Radicella JP. 2001.** XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *EMBO J.* **20**: 6530-6539.
- Villano JL, Seery TE, Bressler LR. 2009.** Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. *Cancer Chemother Pharmacol.* **64**: 647-655.
- Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. 2001.** Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature.* **412**: 607-614.
- Wang H, Zeng ZC, Bui TA, Sonoda E, Takata M, Takeda S, Iliakis G. 2001.** Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene.* **20**: 2212-2224.
- Wang J, Pluth JM, Cooper PK, Cowan MJ, Chen DJ, Yannone SM. 2005.** Artemis deficiency confers a DNA double-strand break repair defect and Artemis phosphorylation status is altered by DNA damage and cell cycle progression. *DNA Repair (Amst).* **4**: 556-570.
- Wang Q, Chan TR, Hilgraf R, Fokin VV, Sharpless KB, Finn MG. 2003.** Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. *J Am Chem Soc.* **125**: 3192-3193.
- Ward JF. 1995.** Radiation Mutagenesis - the Initial Dna Lesions Responsible. *Radiation Research.* **143**: 355
- Ward JF. 2000.** Complexity of damage produced by ionizing radiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **65**: 377-382.
- West MH, Bonner WM. 1980.** Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry.* **19**: 3238-3245.
- Weterings E, Chen DJ. 2007.** DNA-dependent protein kinase in nonhomologous end joining: a lock with multiple keys? *J Cell Biol.* **179**: 183-186.
- Weterings E, Chen DJ. 2008.** The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res.* **18**: 114-124.
- Weterings E, van Gent DC. 2004.** The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA Repair (Amst).* **3**: 1425-1435.
- Weterings E, Verkaik NS, Brüggewirth HT, Hoeijmakers JH, van Gent DC. 2003.** The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic Acids Res.* **31**: 7238-7246.
- Whitehouse CJ, Taylor RM, Thistlethwaite A, Zhang H, Karimi-Busheri F, Lasko DD, Weinfeld M, Caldecott KW. 2001.** XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell.* **104**: 107-117.
- Wu J, Liu LF. 1997.** Processing of topoisomerase I cleavable complexes into DNA damage by transcription. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4181-4186.

Wu L, Hickson ID. 2003. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature*. **426**: 870-874.

Wu W, Wang M, Wu W, Singh SK, Mussfeldt T, Iliakis G. 2008. Repair of radiation induced DNA double strand breaks by backup NHEJ is enhanced in G2. *DNA Repair (Amst)*. **7**: 329-338.

Wyatt MD, Pittman DL. 2006. Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol*. **19**: 1580-1594.

Xie A, Hartlerode A, Stucki M, Odate S, Puget N, Kwok A, Nagaraju G, Yan C, Alt FW, Chen J, Jackson SP, Scully R. 2007. Distinct roles of chromatin-associated proteins MDC1 and 53BP1 in mammalian double-strand break repair. *Mol Cell*. **28**: 1045-1057.

Yang HJ, Li QB, Fan J, Holloman WK, Pavletich NP. 2005. The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction. *Nature*. **433**: 653-657

Yu DS, Sonoda E, Takeda S, Huang CL, Pellegrini L, Blundell TL, Venkitaraman AR. 2003. Dynamic control of Rad51 recombinase by self-association and interaction with BRCA2. *Mol. Cell*. **12**: 1029-1041.

Yun MH, Hiom K. 2009. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature*. **459**: 460-U184.

Zachos G, Rainey MD, Gillespie DA. 2005. Chk1-dependent S-M checkpoint delay in vertebrate cells is linked to maintenance of viable replication structures. *Mol Cell Biol*. **25**: 563-574.

Zdzienicka MZ, Tran Q, van der Schans GP, Simons JW. 1988. Characterization of an X-ray-hypersensitive mutant of V79 Chinese hamster cells. *Mutat Res*. **194**: 239-249.

Zdzienicka MZ, van der Schans GP, Natarajan AT, Thompson LH, Neuteboom I, Simons JW. 1992. A Chinese hamster ovary cell mutant (EM-C11) with sensitivity to simple alkylating agents and a very high level of sister chromatid exchanges. *Mutagenesis*. **7**: 265-269.

Zhang J, Ma Z, Treszezamsky A, Powell SN. 2005. MDC1 interacts with Rad51 and facilitates homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol*. **12**: 902-909.

Zhu Z, Chung WH, Shim EY, Lee SE, Ira G. 2008. Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell*. **134**: 981-994.

Zhou C, Li Z, Diao H, Yu Y, Zhu W, Dai Y, Chen FF, Yang J. 2006. DNA damage evaluated by gammaH2AX foci formation by a selective group of chemical/physical stressors. *Mutat Res*. **604**: 8-18.

Zou L, Elledge SJ. 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*. **300**: 1542-1548.

Internetquelle:

www.onmeda.de/lexika/strahlenmedizin

7 Anhang

7.1 Lebenslauf

Name: Michael Marc Ensminger
Geburtstag: 08.01.1981
Geburtsort: Neunkirchen (Saar)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Berufstätigkeit im Rahmen der Promotion:

07/2007 – 12/2011 Technische Universität Darmstadt
Abteilung Strahlenbiologie und DNA-Reparatur
Arbeitsgruppe Prof. Löbrich

01/2007 – 06/2007 Universität des Saarlandes
Institut für Biophysik
Arbeitsgruppe Prof. Löbrich

Studium:

10/2001 – 11/2006 Universität des Saarlandes
Studiengang Biologie mit
Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie
Abschluss: Diplom

Berufstätigkeit:

10/2000 – 8/2001 Zivildienst am Uniklinikum Homburg

Schulische Bildung:

08/1991 – 06/2000 Gymnasium Johanneum Homburg
Abschluss: Abitur

09/1987 – 06/1991 Grundschule Oberbexbach

7.2 Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, Barton O, Jeggo PA. 2010. gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle*. **9**: 662-669

Nikolova T, Ensminger M, Löbrich M, Kaina B. 2010. Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methyl methanesulfonate. *DNA Repair (Amst)*. **9**: 1050-1063

GSI Annual Reports:

Ensminger M, Taucher-Scholz G, Löbrich M, Krempler A. 2007. DNA Damage after High-LET Exposure.

Ensminger M, Conrad S, Taucher-Scholz G, Krempler A, Löbrich M. 2008. DNA Damage after High-LET Exposure.

Ensminger M, Conrad S, Beucher A, Taucher-Scholz G, Löbrich M. 2009. DNA Damage after High-LET Exposure.

Ensminger M, Conrad S, Beucher A, Taucher-Scholz G, Löbrich M. 2010. DNA Damage after High-LET Exposure.

Tagungsbeiträge

Ensminger M, Krempler A, Löbrich M.

„Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche in der S-Phase“
Vortrag, 10. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V., Mainz 2007

Ensminger M, Ebel. C, Naumann S, Nikolova T, Kaina B, Löbrich M.

„Repair pathway requirements for one ended versus two ended DNA double strand breaks“
Vortrag, 12. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V., Essen 2009

Ensminger M, Conrad S, Ebel C, Barton O, Beucher A, Tchouandong L, Nikolova T, Kaina B, Jeggo PA, Löbrich M.

„Ionizing radiation induced DSBs in G2 phase are repaired by a branch of homologues recombination that differs from S phase mediated HR“
Posterpräsentation, 11th Biennial Meeting of the DGDR, Jena 2010

Auszeichnungen:

Reisestipendium anlässlich der Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V., Mainz 2007

Reisestipendium anlässlich der Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V., Essen 2009

Posterpreis, 11th Biennial Meeting of the DGDR, Jena 2010

7.3. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Markus Löbrich für die Bereitstellung des interessanten Themas meiner Dissertation, die guten Zusammenarbeit in den letzten fünf Jahren, die stets offene Tür, die unerschöpfliche Diskussionsbereitschaft und für die vielen guten Ideen und Ratschläge für meine Arbeit.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Gerhard Thiel für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung dieser Arbeit.

Ich danke Frau Prof. Barbara Drossel und Herrn Prof. Marco Durante für ihre Bereitschaft als Prüfer meiner Arbeit zu agieren.

Bei Herrn Prof. Bernd Kaina und Frau Dr. Teodora Nikolova von der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit bei unserem gemeinsamen Forschungsprojekt.

Mein herzlicher Dank gilt allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Löbrich. Ich danke euch für das gute Arbeitsklima, den Zusammenhalt, die Hilfsbereitschaft und die vielen lustigen Momente, die ich mit euch erleben durfte. Danke, dass ich bei euch so sein kann, wie ich bin.

Desweiteren möchte ich all denen danken, die mich in den letzten Wochen durch Korrekturlesen und das ein oder andere aufbauende Wort während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich danke Helge Hussong, Petra Frieß, Kerstin Hirschfelder und Julia Naumann für die fünf Jahre gemeinsamen Studiums und die vielen unvergesslichen gemeinsamen Momente. Es war schön diesen Weg mit euch zusammen zu gehen.

Ferner gilt mein Dank allen meinen Freunden, die mich so mögen und nehmen, wie ich bin.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie. Danke für euren Glauben an mich, eure Liebe, den Rückhalt, den ihr mir gebt, und für eure uneingeschränkte Unterstützung bei allem, was ich tue.
